

**Immunhistochemische, molekularbiologische Beurteilung
von koronarchirurgischem Graftmaterial
bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus
mit besonderer Berücksichtigung von Genen,
die eine Graftsklerose beschleunigen können**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Ulrike Seybt
geboren am 05.03.1989 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Torsten Doerst, Jena

2. PD Dr. Ralf Claus, Jena

3. Prof. Dr. Khosro Hekmat, Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Einleitung	7
1. Koronare Herzkrankheit	7
2. Arteriosklerose	8
2.1 Aufbau von Arterien und Venen	9
2.2 Pathogenese der Arteriosklerose	9
3. Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen	11
4. Bypassoperation und Graftsklerose	12
4.1 Chirurgische Technik	12
4.2 Unterschiede nach der Bypassoperation	13
5. Grundlage und Vorarbeiten	14
5.1 CD68	15
5.2 Stat1 (Signal Transducers and Activators of Transcription)	15
5.3 HLA-DRB1	16
Zielsetzung	17
Material und Methoden	18
1. Material	18
1.1 Primärantikörper	18
1.2 Histologie	18
1.3 Immunhistochemie	18
1.4 PCR	19
1.5 Primersequenzen	19
1.6 Geräte	19
2. Methoden	20
2.1 Probenbank	20
2.2 Histologie	20
2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	21
2.2.2 Elastika-van-Gieson-Färbung	22
2.3 Real-Time PCR	22
2.3.1 RNA-Isolation	22
2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	23
2.3.3 Elektrophorese	23
2.3.4 Reverse Transkription	24
2.3.5 Primerdesign	25
2.3.6 Real-Time-PCR	26
2.3.7 PCR-Ansätze und Reaktionsbedingungen	26
2.3.8 CT-Wert-Bestimmung	27
2.3.9 Schmelzkurvenanalyse	28
2.3.10 Überprüfung der PCR-Produkte mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese	28
2.3.11 Relative Quantifizierung	29

2.4 Immunhistochemie	30
2.4.1 Protokoll	31
2.5 Statistik	32
Ergebnisse	33
1. Resultate der histologischen Färbungen	34
1.1 Morphologie des Gefäßmaterials	34
2. Molekularbiologische Identifikation von potentiell an einer Graftsklerose beteiligten Genen	40
2.1 Genchipanalyse von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus	40
2.2 Nachweis von RNA-Integrität	41
2.3 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse ausgewählter Zielgene	42
2.4 Charakterisierung der Produkte aus der RT-PCR	43
3. Resultate der immunhistochemischen Färbungen	44
3.1 Immunhistochemische Untersuchung von Genprodukten	44
3.1.1 Immunhistochemische Untersuchung des Genprodukts von Stat1	45
3.1.2 Immunhistochemische Untersuchung des Genprodukts von CD68	47
Diskussion	49
1. Auffälligkeiten in der Patientencharakteristik	49
2. Veränderungen der Gefäßwand in Venen und Arterien	50
3. Expressionsgrad der untersuchten Gene auf mRNA-Ebene	52
4. Proteinexpression in der Immunhistochemie	54
Schlussfolgerung	56
Literaturverzeichnis	57
Tabellenverzeichnis	60
Abbildungsverzeichnis	61
Lebenslauf	62
Danksagung	64
Ehrenwörtliche Erklärung	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
β-Aktin	Beta-Aktin
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CABG	coronary artery bypass graft
CD68	cluster of differentiation 68
cDNA	complementary DNA
Ct-Wert	cycle threshold Wert
DEPC-Wasser	Diethylprocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Δ	delta
EvG-Färbung	Elastika-van-Gieson Färbung
FKS	fetales Kälberserum
fw	forward
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HbA1c	glykosyliertes Hämoglobin
HDL	high-density lipoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HLA-DRB1	Humanes-Leukozyten-Antigen DRB1
JAK	Januskinase
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior decending (artery)
LDL	low-density lipoprotein
MHC Molekül	major histocompatibility complex Molekül
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)

μ	mikro
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OGTT	oraler Glukose Toleranztest
PBS	phosphate buffered saline (Pufferlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
rev	reverse
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real-Time PCR
sec	Sekunde
Stat1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1
V	Volt
WHO	World Health Organization

Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Ursache für Todesfälle in Deutschland (Statistisches-Bundesamt 2010). Dabei wird die koronare Herzkrankheit durch eine Arteriosklerose an den Herzkranzgefäßen verursacht. Nach einer deshalb durchgeführten Bypassoperation zeigen Patienten mit Diabetes mellitus eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Thourani et al. 1999). Sie weisen dabei ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Graftsklerose auf. Die Ursachen für eine beschleunigte Graftsklerose bei Diabetes sind nicht bekannt. Daher sollten in dieser Dissertationsarbeit mögliche Faktoren für eine beschleunigte Graftsklerose bei Diabetikern überprüft werden.

Es wurden Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren eingeschlossen, die sich im Jahr 2010 einer aortokoronaren Bypassoperation an der Klinik für Herz-und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Jena unterzogen. Dabei wurden Patienten mit normalen HbA1c-Werten der Kontrollgruppe zugeordnet. Patienten mit Diabetes mellitus stellten die zu untersuchende Risikogruppe dar.

An den entnommenen Gefäßen wurden histologische, molekularbiologische und immunhistologische Untersuchungen wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Es wurden Stücke von Venen und Arterien genutzt, die während einer Bypassoperation nicht verwendet wurden und anschließend aufgearbeitet werden konnten. Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Elastika-van-Gieson-Färbung wurden Intimadicke und Mediadicke der Gefäße bestimmt sowie verglichen. Die Genexpression in den Gefäßen wurde durch RNA-Isolation von potentiell an einer beschleunigten Graftsklerose beteiligten Genen untersucht. Dafür wurde auf eine vorhergehende Arbeit Bezug genommen, die bereits Gefäße von Bypass-Patienten untersuchte. Aus dem dort durchgeführten Array wurden die Gene CD68, Stat1 und HLA-DRB-1 ausgewählt und hier weiterführend untersucht, weil sie in der Patientengruppe mit Diabetes mellitus verstärkt exprimiert waren. Diese Gene könnten an einer beschleunigten Graftsklerose beteiligt sein. Die Ergebnisse aus der PCR wurden zwischen Kontrollgruppe und Risikogruppe verglichen. In der Immunhistochemie wurde die Verteilung der Proteine im Gefäßquerschnitt untersucht. Gemessen wurde die jeweilige Signalstärke der Proteine pro Fläche in der Intima.

Die Risikogruppe der Studie bestand aus 22 Patienten mit Diabetes mellitus. Davon waren 86% Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 66,7 Jahren und einem Gewicht von 95,6 kg. Die Kontrollgruppe stellten 22 Patienten mit normalen HbA1c-Werten dar. Sie waren zu 82% männlich, durchschnittlich 63,8 Jahre alt und wogen 84,4kg.

Morphologisch wiesen die venösen Gefäße von Diabetikern eine Verdickung der Intima auf, was auf eine pathologische Gefäßwandveränderung hindeutete. So nahm bei Venen in der Risikogruppe die Intima im Mittel eine Fläche von 22,5% der gesamten Gefäßwand im Querschnitt ein. In der Kontrollgruppe waren es 19,3%. Die Intimadicke betrug bei arteriellen Gefäßen der Risikopatienten im Durchschnitt 8,8% der Gefäßwand im Vergleich zu 10,3% in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der RT-PCR ließen für Stat1 Tendenzen zu einer erhöhten Expression in der Risikogruppe bei venösen und arteriellen Gefäßen erkennen. Wohingegen die Resultate der vorangegangenen Genchipanalyse auf eine verringerte Expression von Stat1 in der Risikogruppe hinwiesen. Die Betrachtung der Genexpression von HLA-DRB1 zeigte in der Genchipanalyse als auch in der RT-PCR eine gleichsinnige Veränderung der Expression bei Patienten mit Diabetes mellitus. Bei den Venen war tendenziell eine Herabregulation nachweisbar und bei den Arterien eine Heraufregulation von HLA-DRB1 in der Risikogruppe. Bei der Analyse der Proteinexpression waren für humanes Stat1 sowie CD68 keine Unterschiede nachweisbar. Die Signalintensität der Proteine in der Intima differierte nicht zwischen Kontrollgruppe und Risikogruppe bei den untersuchten venösen Gefäßen.

Die Morphologie zeigte bei Arterien und Venen jeweils keinen Unterschied zwischen Risiko- und Kontrollgruppe. Zwischen Arterien und Venen war die Intimadicke in beiden Gruppen jedoch verschieden. Die Genexpression deutete eine mögliche Beteiligung von Stat1 und HLA-DRB1 an. Diese ließ sich aber in der Immunhistochemie nicht nachweisen. Dort waren keine Unterschiede zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern detektierbar.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass CD68, Stat1 und HLA-DRB1 bis zum Zeitpunkt der koronaren Bypassoperation nicht an Wandveränderungen der Graftgefäße bei Diabetes mellitus beteiligt sind. Die Prozesse, welche zu einer beschleunigten Graftsklerose führen, scheinen erst zu einem späteren Zeitpunkt einzusetzen.

Einleitung

1. Koronare Herzkrankheit

Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches-Bundesamt 2010) (Abb.1).

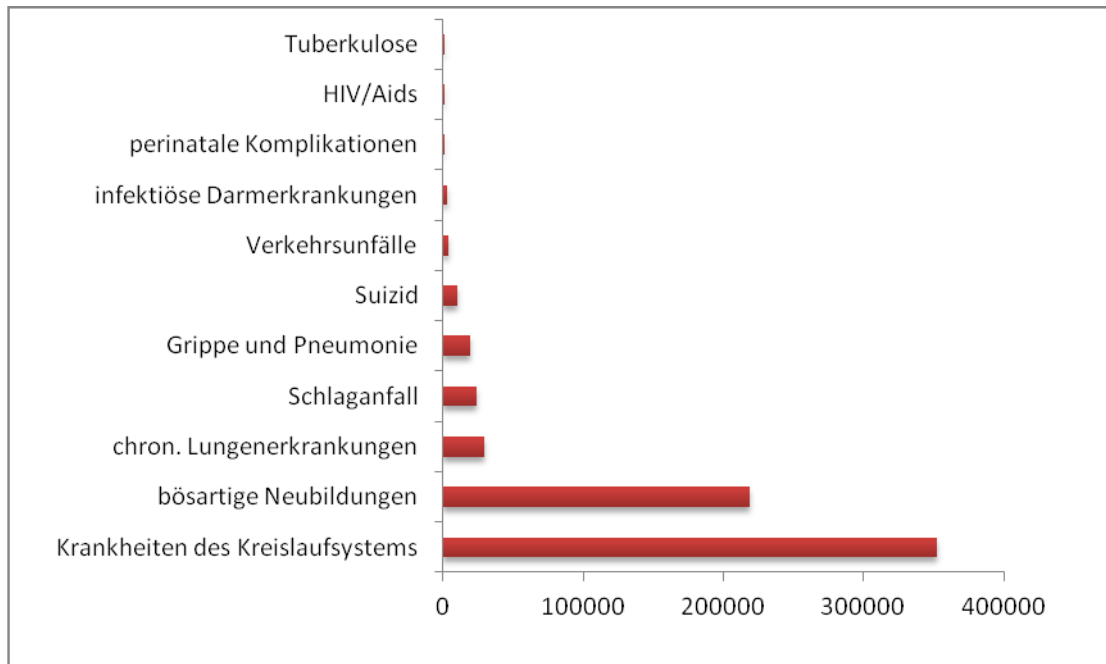


Abbildung 1: KHK als häufigste Todesursache im Jahr 2010 in Deutschland
(Statistisches-Bundesamt 2010)

Dabei wird die koronare Herzkrankheit (KHK) durch eine Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzgefäßen ausgelöst. Sie kann bis zu einem vollständigen Verschluss der Koronargefäße führen. Schon in einer frühen Phase der Erkrankung bestehen Störungen in der endothelialen Funktion und Lipideinlagerungen in der Gefäßwand, währenddessen die Patienten noch keine Beschwerden angeben. Mit weiterem Fortschreiten der KHK sinkt das Sauerstoffangebot im Herzmuskel und wird vom Sauerstoffbedarf überstiegen. Dieses Missverhältnis stellt sich klinisch erst belastungsabhängig und später auch in Ruhe als Angina pectoris dar (Nationale-Versorgungsleitlinie 2013). Die Myokardischämie verursacht Herzinsuffizienz, Myokardinfarkte und Herzrhythmusstörungen. Als Hauptrisikofaktoren der KHK gelten das Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie (Wilson 1994). Sie nehmen Einfluss auf den Grad und das Voranschreiten der arteriosklerotischen Gefäßveränderungen.

2. Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist laut einer Definition der WHO aus dem Jahre 1957 eine variable Kombination von Veränderungen der Gefäßintima. Sie besteht aus herdförmigen Anhäufungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen. Gleichzeitig entsteht ein fibröses Gewebe, Kalkablagerungen und zusätzlich Veränderungen in der Gefäßmedia (World-Health-Organisation 1958). Dieser Umbau der Gefäßwand führt dazu, dass sie verdickt, verhärtet und an Elastizität verliert. Sie stellt die mit Abstand häufigste Erkrankung der Arterien des Menschen dar und ist in erster Linie eine Erkrankung der Intima, welche im weiteren Verlauf auf die Media übergeht. Die Arteriosklerose ist eine komplexe Erkrankung, für deren Pathogenese die fokalen Veränderungen auf Stoffwechselstörungen hindeuten (Remmele 1999). Für die Entstehung der Arteriosklerose gibt es keine einzelne Ursache, sondern viele Faktoren. Sie beeinflussen sich gegenseitig und führen in ihrem Zusammenspiel zu einem Krankheitsfortschritt. Man differenziert zwischen Risikofaktoren erster Ordnung und zweiter Ordnung. Risikofaktoren erster Ordnung sind die arterielle Hypertonie, welche zu Endothelschäden führt, und der Diabetes mellitus, welcher die Glykosylierung von Proteinen begünstigt und sekundär eine Hyperlipidämie fördert. Eine Fettstoffwechselstörung beschleunigt die Arteriosklerose vor allem bei hohen LDL (low density lipoprotein)-Cholesterin-Spiegeln und gleichzeitig niedrigen HDL (high density lipoprotein)-Cholesterin-Spiegeln. Der Nikotinabusus erhöht den Cholesterinspiegel, führt zu einer Gefäßverengung und stört die Thrombozytenfunktion. Desweiteren erhöht sich mit zunehmendem Alter das Arterioskleroserisiko. In der 5. Lebensdekade steigt das Risiko um das Fünffache. Außerdem sind Männer häufiger und früher von Arteriosklerose sowie ihren Erkrankungsfolgen betroffen als Frauen. Nach der Menopause gleichen sich Morbidität und Mortalität allerdings an. Zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung gehören Adipositas, Bewegungsmangel, Stress sowie eine familiäre Vorbelastung (Riede et al. 2004). Die meisten dieser Einflussfaktoren sind eine Folge des geänderten Lebensstils in den Industriestaaten. Dieser besteht aus einer gesteigerten Kalorienzufuhr mit gleichzeitig immer weniger werdender körperlicher Aktivität. Parallel dazu erreichen die Menschen ein immer höheres Lebensalter mit dadurch steigendem Risiko für das Auftreten von Veränderungen im Aufbau der Gefäßwände von Arterien und Venen (Remmele 1999).

2.1 Aufbau von Arterien und Venen

Die Wand von Arterien setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die an das Lumen angrenzende ist die Tunica intima. Sie besteht aus dem Endothel und der darunter gelegenen subendothelialen Schicht. Diese enthält glatte Muskelzellen, Fibrozyten sowie kollagene und elastische Fasern. Die Membrana elastica interna bildet den Abschluss zu der weiter außen gelegenen Tunica media. Zirkuläre glatte Muskelzellen und dazwischen gelagerte elastische Fasern bilden das Grundgerüst der Media. Die Membrana elastica externa ist ebenso wie die Membrana elastica interna nicht klar von den anderen elastischen Lamellen der Media abzugrenzen. Die folgende Tunica adventitia stellt die äußerste Schicht der Gefäßwand dar und verankert die Arterien in ihrer Umgebung. Sie setzt sich locker aus elastischen Fasern, Fibroblasten sowie Kollagenfibrillen zusammen. In ihr verlaufen einige Vasa vasorum, die bis an die Tunica media heran reichen können und die außen liegenden Anteile der Gefäßwand versorgen. Die Adventitia geht in das angrenzende Bindegewebe über (Lüllmann-Rauch 2009) .

Bei den venösen Gefäßen ist der dreischichtige Wandaufbau aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia unscharf ausgebildet. Die Intima besteht aus dem Endothel, welches den Intravasalraum abgrenzt, und einer subendothelialen Schicht. In der Media sind zirkuläre und longitudinale Muskelstränge zu erkennen, die jedoch nicht so dicht beieinander liegen wie es bei Arterien der Fall ist. Die Muskelfasern werden von zahlreichen elastischen und kollagenen Fasern durchsetzt, welche die Grundlage für die Dehnbarkeit der Gefäßwand bilden. Die Adventitia als äußere Schicht besteht hauptsächlich aus Bindegeweben und kann auch longitudinale sowie glatte Muskulatur beinhalten (Lüllmann-Rauch 2009). Die Venen erscheinen auf Querschnittsbildern im Vergleich zu den Arterien eher lang gestreckt und weniger rund. Im Endothel und der Tunica intima von Arterien als innerster Schicht der Gefäßwand beginnt die Entwicklung der Arteriosklerose.

2.2 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose kann an mehreren Arterien eines Patienten eine uneinheitliche Ausprägung besitzen. Dies ist durch einen zeitlich unterschiedlichen Beginn sowie eine verschieden schnelle Geschwindigkeit in der Entwicklung der Erkrankung bedingt (Remmele 1999).

Am Anfang der Pathogenese steht eine Endothelverletzung. Dabei scheinen Hypercholesterinämie, Nikotinabusus sowie eine Wirbelbildung im Blutfluss eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Verwirbelung des Blutes tritt hauptsächlich an Gefäßabgängen auf, wo die Arteriosklerose schon in frühem Lebensalter nachweisbar ist. Sie führt zu für die Endothelzellen schädigenden Scherkräften. Das Endothel wird durchlässiger. Es bildet Chemokine und Adhäsionsmoleküle, wodurch Blutmonozyten und T-Lymphozyten einwandern. Durch die zusätzliche Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen werden die Monozyten in Makrophagen umgewandelt. Außerdem drosselt das Endothel die Herstellung von Stickstoffmonoxid, wodurch das Blutgefäß über diesen Mechanismus keine Vasodilatation mehr erreichen kann. Im Blut zirkulierende HDL- und LDL-Cholesterine gelangen in die Intima und lagern sich dort entsprechend ihrer Blutkonzentration ab (Riede et al. 2004).

Das LDL wird in der Intima oxidiert. Makrophagen nehmen diese oxidierte LDL-Form über Scavenger-Rezeptoren auf und sie gelangen in Lysosomen. Die entstandenen Cholesterinester lagern sich in großen Mengen in den Vakuolen ab. Dadurch werden die Makrophagen zu „Schaumzellen“ (Lipophagen) und es entstehen Fettstreifen in der Intima. Sie stellen sich als gelbliche, streifenförmige Ablagerungen in der Gefäßinnenseite dar (Riede et al. 2004). Das HDL-Cholesterin ist ein Schutzfaktor gegen die Entwicklung der Arteriosklerose. Es fördert die Mobilisierung von Cholesterin aus der arteriosklerotisch veränderten Arterienwand. HDL transportiert überschüssiges Cholesterin in die Leber und sorgt über die Galle für dessen Ausscheidung. Außerdem kann HDL die Oxidation von LDL verhindern, wodurch weiterhin kein oxidiertes LDL in der Intima abgelagert werden kann (Riede et al. 2009).

Anschließend entwickeln sich Lipidplaques, denn die Lipophagen können das Cholesterin nicht abbauen. Es kristallisiert aus und die Lipophagen gehen in großer Anzahl in die Apoptose über. Durch das Sterben der Makrophagen in der Intima wird ihr enthaltenes Fett freigesetzt. Bei Körpertemperatur entsteht ein flüssiger Fettbrei mit Cholesterinkristallen. Dieser wird auch als Atherom bezeichnet. So eine Plaque ist mechanisch instabil (Riede et al. 2004).

Noch vorhandene Lipophagen und Endothelien geben proinflammatorische Signale (Endothelin-1, Interleukin-1) sowie Wachstumsfaktoren ab. Diese bewirken die Einwanderung von Mediamyozyten sowie deren Proliferation. Die eingewanderten

Mediamyozyten bilden Kollagenfasern und es kommt zu einer Fibrosierung der Gefäßwand. Anschließend verkalkt diese und es entsteht ein Fibroatherom. Die ebenfalls aktivierten Endothelzellen setzen den Plättchenaktivierungsfaktor frei, welcher Thrombozyten anzieht (Riede et al. 2004).

Die Oberfläche des Fibroatheroms wird durch Matrixmetallproteasen aus den Makrophagen proteolytisch angegriffen und bei hoher mechanischer Belastung reißt es ein. Das zirkulierende Blut dringt in die Plaque ein. Die Gerinnungsfaktoren kommen mit dem Plaqueinhalt in Kontakt, was thrombogen wirkt. Es entsteht ein parietaler Thrombus an der Gefäßwand. Überwiegen in diesem Moment die prothrombotischen Signale im Körper kann sich auch ein okklusiver Thrombus bilden, was sich klinisch als eine Verschlusskrankheit am entsprechenden Organ äußern würde, z.B. als akutes Koronarsyndrom (Riede et al. 2004).

Im weiteren Ablauf erfolgt die Organisation des entstandenen Thrombus. Das bedeutet die Oberfläche wird reendothelialisiert, Granulationsgewebe eingebaut, der Thrombus verwächst mit der Gefäßwand und es kommt zu einer Rekanalisation des Gefäßabschnitts. Myozyten, die von der Media in die Intima eingewandert sind, teilen sich und produzieren verstärkt Kollagen sowie andere extrazelluläre Matrix. Dadurch vergrößert sich eine einmal entstandene Plaque und kann dabei zusätzlich Calciumcarbonat aus dem Blut einlagern. Solche Plaques sind stabil und engen das Gefäßlumen stark ein. Diese voll ausgebildete Arteriosklerose äußert sich am Herzen mit den Symptomen einer Angina pectoris (Riede et al. 2004). Dabei stellen Patienten mit Diabetes mellitus eine große Gruppe der Betroffenen dar.

3. Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen

Über die Hälfte aller Patienten mit koronarer Herzkrankheit hat eine gestörte Glukosetoleranz oder einen Diabetes mellitus. Dieser wird jedoch nicht bei allen Patienten rechtzeitig entdeckt und behandelt (Bartnik et al. 2004). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wird bei Durchführung eines oralen Glukose Toleranztests (OGTT) bei mehr als einem Drittel eine bisher nicht bekannte, gestörte Glukosetoleranz auffällig (Drechsler et al. 2008). Dabei gehört Diabetes mellitus zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer KHK und dessen Behandlung ist von Vorteil für den weiteren Krankheitsverlauf (Wilson 1994). Dennoch zeigen Diabetiker trotz sich weiterentwickelnder Therapiemöglichkeiten in der Behandlung einer KHK eine erhöhte Morbidität und Mortalität kardialer Ursache. Dies gilt für einen

5 Jahres Zeitraum bei medikamentöser Therapie, bei PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) und auch bei CABG (coronary artery bypass graft) (Hueb et al. 2007).

Patienten mit Diabetes mellitus und einer zusätzlichen Niereninsuffizienz stellen eine Gruppe mit besonders hohem Risiko dar. Zu Beginn einer Dialysebehandlung lassen sich bereits bei über 40% der Patienten schwerwiegende Koronarstenosen nachweisen. Die Haupttodesursache sind das akute Koronarsyndrom und der plötzliche Herztod. Durch eine kardiologische Behandlung oder die herzchirurgische Therapie mit einer Bypassoperation kann die Komplikationsrate durch kardiovaskuläre Ereignisse gesenkt werden (Weidtmann 2007).

4. Bypassoperation und Graftsklerose

Die koronare Herzkrankheit ist eine Volkskrankheit und die Hauptursache für Todesfälle in Deutschland. Dabei zeigt sich bei Männern ein höherer Anteil an Myokardinfarkten und kardialen Tod als bei Frauen. Die Letalität ist beim akuten Herzinfarkt immer noch auf einem sehr hohen Stand, wobei der überwiegende Teil der betroffenen Patienten vor dem Erreichen eines Krankenhauses verstirbt (Nationale-Versorgungsleitlinie 2013). Die koronare Bypassoperation (CABG) ist eine bewährte chirurgische Therapieoption der KHK seit ihrer erstmaligen Beschreibung durch Favaloro (Favaloro 1968). So wurden in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Jena im Jahr 2011 562 isolierte Bypassoperationen durchgeführt.

Indikationen für eine Bypassoperation sind im Zusammenhang mit einer klinischen Symptomatik interventionell nicht behandelbare Stenosen über 70%, eine Hauptstammstenose über 50% und eine 3-Gefäß-Erkrankung mit proximaler RIVA-Stenose (Nationale-Versorgungsleitlinie 2013). Voraussetzung für die Operation sind die Durchgängigkeit der distalen Koronararterie sowie operationstechnisch ihre Anastomisierbarkeit.

4.1 Chirurgische Technik

Eine Bypassoperation erfolgt in Intubationsnarkose und kann mit oder ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine erfolgen. Im konventionellen Verfahren wird der Brustkorb eröffnet und die A. thoracica interna freipräpariert. Sie verläuft parallel zum Sternum unterhalb der endothorakalen Faszie. Die Präparation erfolgt kranial bis zu

ihrem Abgang aus der A. subclavia. Die A. thoracica interna verbleibt in-situ bis zur Anastomisierung.

Währenddessen kann parallel dazu am Bein die V. saphena magna freigelegt und entnommen werden. Diese Vene wird als freies Bypasstransplantat genutzt und kann an einer anderen Stelle in das Koronargeäßsystem eingebaut werden.

Bei Verwendung der extrakorporalen Zirkulation erfolgt die Heparinisierung und darauffolgend wird der Patient an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Eine kardioplege Lösung verhindert Herzaktionen im weiteren Operationsverlauf.

Die A. thoracica interna wird nun distal abgesetzt und mit einem aortokoronaren Gefäß anastomosiert, z.B. mit der LAD (left anterior descending). Die entnommene Vene wird proximal direkt an der Aorta ascendens anastomosiert und distal ebenso mit einem Koronargeäß.

Nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation erhält der Patient Protamin, um das anfangs erhaltenen Heparin zu antagonisieren. Im Operationsgebiet werden eventuelle Blutungsquellen gestillt. Dann erfolgt der Verschluss des Brustkorbs. Der Patient kommt zur weiteren Überwachung auf die Intensivstation und bei regelrechtem Verlauf am Folgetag der Operation zurück auf Normalstation. Der langfristige Erfolg der revaskularisierenden Bypassoperation zeigt sich erst mit dem Offenbleiben der Gefäße nach Jahren.

4.2 Unterschiede nach der Bypassoperation

Bei Patienten mit einer Mehrgefäß-KHK und Angina pectoris zeigte sich in der BARI-Studie in einer Subgruppe ein Vorteil der CABG im Vergleich zur PTCA. Diese Subgruppe bestand aus Patienten mit Diabetes mellitus, die mindestens eine A. thoracica interna als Graft bekamen. Die 7-Jahres-Überlebensrate lag für diese Subgruppe bei 83,2%. Diabetiker mit einem venösen Graft hatten dagegen eine Überlebensrate von lediglich 54,5%, was nahe an der Rate von 55,5% bei PTCA lag. Bei Patienten ohne Diabetes mellitus unterschieden sich die drei Behandlungsmethoden in den Überlebensraten nicht (The-BARI-Investigators 2000). Das heißt ein Überlebensvorteil zeigte sich nur bei revaskularisierten Patienten mit behandeltem Diabetes mellitus im Vergleich zu einer anderen Therapie, wenn ein Bypass mit einer A. thoracica interna verwendet wurde.

Patienten mit einem behandlungsbedürftigen Diabetes mellitus zeigen nach einer Bypassoperation weiterhin eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Dabei spielt eine endotheliale Dysfunktion im Graft eine Rolle, da Diabetes zu einer verminderten Freisetzung von Stickstoffmonoxid beiträgt, welches gefäßdilatierend wirkt (Thourani et al. 1999). Als Bypassgraft finden zurzeit arterielle wie venöse Gefäße Verwendung. Es bestehen unterschiedliche Auffassungen welche Maßnahme die größten Vorteile bietet. In den meisten Studien zeigt die Versorgung mit einer A. thoracica interna die größten Offenheits- und Überlebensraten in Nachuntersuchungen (Hortmann et al. 2010) (Cho et al. 2006) (Falk et al. 2002). Für die Verwendung zusätzlicher Bypassgefäße gibt es Studien, die für die Verwendung einer A. radialis im Vergleich zur V. saphena magna (Hu und Zhao 2011) (Athanasίου et al. 2010) wie auch dagegen (Hortmann et al. 2010) (Buxton et al. 2003) sprechen oder keine Unterschied in der Offenheitsrate feststellen (Hayward et al. 2010).

Dabei werden die für einen aortokoronaren Bypass eingesetzten Venen im Gegensatz zu den Arterien von einem Niederdrucksystem in ein Hochdrucksystem verpflanzt. Sie sind damit einer veränderten Belastung ausgesetzt wie atypischen Druckverhältnissen sowie einem pulsatilen Blutfluss. Dies sind pathognomonische Faktoren, die zu Umbauprozessen in der Gefäßwand und obstruktiven Läsionen führen können. Histologisch zeigen sich Mikrotraumen des Endothels, fibröse Verdickungen der Intima mit Fettablagerungen und Nekrosen sowie Fibrosen in Media und Adventitia (Campeau et al. 1983). Deshalb stenosiert bei venösen Bypässen ein hoher Anteil. Ein Jahr nach einer CABG mit einer V. saphena magna liegt die Offenheitsrate bei 84% und sinkt auf 61% nach zehn Jahren (Goldman et al. 2004). Die arterielle Revaskularisierung rückt mehr in den Vordergrund, weil die Langzeitergebnisse besser sind. So liegt die Offenheitsrate für eine A.thoracica interna nach einem Jahr bei 95% und nach zehn Jahren bei 85% (Goldman et al. 2004). Die Verwendung der A.thoracica interna sinistra für einen Bypass auf den RIVA gilt weltweit als Standardversorgung. Es zeigt sich weiterhin ein Vorteil bei der Verwendung von in-situ-Bypässen im Vergleich zu freien Transplantaten. Auch ist der Durchmesser des eingesetzten Gefäßes von Bedeutung für die Offenheitsrate (Falk et al. 2002).

5. Grundlage und Vorarbeiten

Die Pathomechanismen der Graftsklerose, welche zu einem Verschluss der Bypassgefäße führen, sind komplex. Sie können ausreichend nur mithilfe moderner

Techniken durch die Untersuchung von Gen- und Proteinebene erfasst werden (Hedge et al. 2003). In einer vorhergehenden Arbeit der Herz-und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Jena wurden auf Genebene signifikant unterschiedliche Expressionsgrade von Genen in Arterien und Venen ermittelt, die im Zusammenhang mit einer beschleunigten Graftsklerose stehen (Iffert 2009). Verglichen wurden Patienten mit Diabetes mellitus und/oder Niereninsuffizienz im Vergleich zu Patienten ohne diese Erkrankungen. Bei den venösen Gefäßen zeigten sich bei 12 Genen eine Heraufregulation der Expression und bei den arteriellen Gefäßen bei 18 Genen eine Herabregulation. Diese Gene könnten somit bei der Graftsklerose im koronararteriellen System von Bedeutung sein. Davon wurden CD68, Stat1 und HLA-DRB1 ausgewählt und genauer bestimmt.

5.1 CD68

Das Gen CD68 kodiert ein transmembranäres Glykoprotein. Dieses wird vor allem bei humanen Monozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert. Es ist hauptsächlich an den Lysosomen und Endosomen lokalisiert, ein kleinerer Anteil an der Zelloberfläche. CD68 ist an der Phagozytoseaktivität von Gewebsmakrophagen durch den intrazellulären Metabolismus der Lysosomen als auch durch Zell-Zell-Interaktionen beteiligt, denn CD68 bindet an spezifische Lektine oder Selektine. Die CD68 tragenden Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose durch die Aufnahme von LDL und die daraus resultierende Umwandlung in Schaumzellen. So wurden CD68 positive Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques der Karotisbifurkation nachgewiesen (Endres et al. 1997). In Arterien des Beines (A. femoralis superficialis) zeigte sich eine vermehrte Expression von CD68 bei primären arteriosklerotischen Läsionen (Edlin et al. 2009).

5.2 Stat1 (Signal Transducers and Activators of Transcription)

Das Gen Stat1 kodiert ein Protein, das an der Übertragung von Signalen in den Zellkern beteiligt ist. Die Stat1-Proteine werden durch die rezeptoreigenen Kinasen in der Zellmembran phosphoryliert und formen Dimere. Diese begeben sich zum Zellkern und binden an die DNA, wo sie die Transkription bestimmter Gene aktivieren.

Stat1 fördert über eine gesteigerte Expression von CD36 die Schaumzellbildung und die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen. In Mäusen wurde die

Schaumzellbildung durch eine Defizienz von Stat1 gehemmt (Agrawal et al. 2007). Stat1 wird von dem proinflammatorischen Zytokin Interferon γ aktiviert, welches in arteriosklerotischen Plaques vorkommt und einen Hauptregulator der Arteriosklerose darstellt. Der JAK-STAT-Signalweg spielt dabei eine Schlüsselrolle. Die Aufnahme von modifiziertem LDL in die Makrophagen wird gefördert (Li et al. 2010). Die Aktivierung von Stat1 spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Einleitung einer Apoptose von Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques (Lim et al. 2008).

5.3 HLA-DRB1

Das Protein HLA-DRB1 gehört zu den MHC-Markern vom Typ II. Es existiert ein Polymorphismus mit Hunderten von Allelen. Die Moleküle vom Typ II sind Heterodimere, die aus einer Alphakette (DRA) und einer Betakette (DRB) bestehen. Die MHC Typ II Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Dazu gehören B-Lymphozyten, Makrophagen sowie Dendritische Zellen. Sie präsentieren die Peptide von extrazellulären Antigenen auf der Zelloberfläche, damit diese von CD4-T-Zellen erkannt werden.

Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte sich, dass Allele von HLA-DRB1 zusammen mit einer chronischen Entzündungsreaktion ein entscheidender Faktor in der Entwicklung einer Arteriosklerose sind. HLA-DRB1 trägt dabei zur endothelialen Dysfunktion bei (Gonzalez-Gay et al. 2004).

Zielsetzung

Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist das Risiko für eine beschleunigte Graftsklerose nach einer koronaren Bypassoperation höher. Auf die Beteiligung von bestimmten Genen an diesem Prozess sollte deshalb in dieser Arbeit näher eingegangen werden. Es wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Gen- und Proteinexpression von CD68, Stat1 und HLA-DRB1 in den Gefäßen von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus gibt. Dafür wurden arterielle und venöse Reste von in der Bypassoperation verwendeten Gefäßen entnommen und mithilfe der Histologie, Molekularbiologie und Immunhistochemie aufgearbeitet. Somit sollte bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern die Bedeutung dieser drei Faktoren erfasst werden, die potentiell an einer beschleunigten Arteriosklerose und Graftsklerose beteiligt sind. Durch die Identifizierung dieser und weiterer Faktoren könnten neue Möglichkeiten für eine Behandlung der koronaren Herzkrankheit und für einen Verschluss von Bypassgefäßen entstehen. Dadurch würden diese Gene und deren Proteine als diagnostische und therapeutische Ziele zur Verfügung stehen.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Primärantikörper

Name	Verdünnung	Firma
Mouse-anti-human CD68	1:40	AbD SEROTEC
Rabbit-anti-stat1 alpha	1:100	AbD SEROTEC

1.2 Histologie

Name	Firma
Weigerts Lsg. A alkoholische Hämatoxylin-Lösung	MERCK
Weigerts Lsg. B salzsaure Eisen(III)nitrat-Lösung	MERCK
Elastin nach Weigert Resorcin-Fuchsin- Lösung	MERCK
Pikrofuchsin-Lösung nach van Gieson	MERCK
Eosin G-Lösung (0,5% wässrig)	Carl Roth GmbH+CoKG
Hämalaun-Lsg. (sauer nach Mayer)	Carl Roth
Fluoromount-G™ (slide mounting)	Southern Biotech
Aquatex	MERCK
Shandon Cryomatrix™	Anatomical Pathology

1.3 Immunhistochemie

Name	Firma
Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies	Dako
Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase	Dako
Dako REAL™ Chromogen Red 1	Dako
Dako REAL™ Chromogen Red 2	Dako
Dako REAL™ Chromogen Red 3	Dako
Dako REAL™ AP Substrate Buffer	Dako
Dako REAL™ Levamisole	Dako

AVIDIN/BIOTIN Blocking Kit	LINARIS Biologische Produkte GmbH
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth GmbH+CoKG
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Citronensäure-Monohydrat	Roth

1.4 PCR

Name	Firma
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	QIAGEN
LightCycler®DNA Master SYBR Green I	Roche
RNase AWAY™	Carl Roth GmbH
TRIzol Reagent	Invitrogen
Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas

1.5 Primersequenzen

Oligonukleotid	Sequenz
h_β-Aktin-fw	5'-GGC ATG GGT CAG AAG GAT T-3'
h_β-Aktin-rv	5'-AAG TGT GGT GCC AGA TTT TC-3'
h-stat1-fw	5'-GCC AAA GGA AGC ACC AGA GCC A-3'
h-stat1-rv	5'-TTC AAC AGG CCC CAG CCA GGA A-3'
h-CD68-fw	5'-TAA GCC AAG ATC GCG CCA CTG C-3'
h-CD68-rv	5'-CTC CCT CCC TTC TCC CGA CTG C-3'
h-HLA-DRB1-fw	5'-AGA TGC TGA GTG GAG TCG GGG G-3'
h-HLA-DRB1-rv	5'-CTG CAA AGC CGG GGC AGA AAG T-3'

1.6 Geräte

Name	Firma
Leica TP1020 (Histokinette)	Leica
Leica RM2265 (Schneideautomat)	Leica
Leica EG1160 (Einbettautomat)	Leica
NanoDrop-ND1000	Kisker
Axioskop2 MOT (Mikroskop)	Carl Zeiss
Biofuge fresco Heraeus	Thermo Scientific

2. Methoden

2.1 Probenbank

Es besteht ein positives Votum der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena an der medizinischen Fakultät zum Studienkonzept und den damit verbundenen Arbeiten mit humanem Probenmaterial mit der Bearbeitungsnummer 1678-12/05.

In die Studie wurden Patienten bis zum Alter von 75 Jahren einbezogen, die sich einer Bypassoperation an der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Jena unterzogen. Ihre Aufklärung entspricht den Standards der Deklaration von Helsinki. Die entnommenen Arterien oder Venen wurden präpariert und anschließend durch 4%ige Formaldehydlösung fixiert. Bis zur Weiterverarbeitung verblieben die Gewebestücke für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C. Das übrige Material wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Anonymisierung der Patientendaten wurden die Proben fortlaufend nach Reihenfolge des Eintreffens nummeriert sowie mit Arterie oder Vene gekennzeichnet. Eine Zuordnung zu Kontroll- oder Risikogruppe fand statt, was für die Studie unerlässlich war. Die Risikogruppe besteht aus Patienten mit Diabetes mellitus. Die Kontrollgruppe ist nicht von der genannten Krankheit betroffen.

2.2 Histologie

Die in 4%igem Formaldehyd fixierten Gewebeproben wurden aus dem Kühlschrank in Plastikeinbettkassetten umgelagert und darauffolgend für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Danach verblieben sie in der Citadelle vom Typ LEICA TP 1020 und durchliefen der Reihe nach folgende Gefäße: zweimal 70%iges Ethanol, zweimal 96%iges Ethanol, dreimal 100%iges Ethanol, einmal Ethanol-Xylol-Gemisch (1:1), zweimal Xylol und letztlich zweimal flüssiges Paraffin. Die Proben befanden sich für jeweils eine Stunde in jedem Behältnis, am Ende in heißem Paraffin bis zur Weiterverarbeitung mithilfe der Ausgießstation vom Typ LEICA EG 1160. Das benutzte Einbettungsmedium ist Paraffin, welches auf die Gewebestücke in einer Gießform gegossen wird. Sie wurden möglichst senkrecht ausgerichtet, um später unter dem Mikroskop ein gutes, transversales Bild zu erhalten.

Die fertigen Paraffinblöcke wurden mit dem Rotationsmikrotom des Typs LEICA RM 2265 bei einem Winkel von 4° geschnitten. Die gewählte Schnittdicke betrug 5 µm. Die entstandenen Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen.

2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Routinefärbung. Sie verschafft einen Überblick über die Struktur des Gewebes und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Normalzustand und pathologischen Veränderungen. Zellkerne erscheinen blauviolett gefärbt, ebenso raues endoplasmatisches Retikulum und Knorpelgrundsubstanz. Kollagene Fasern, elastische Fasern, Zytoplasma und Erythrozyten werden rot bzw. rosa gefärbt.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Gewebeschnitte zuerst im organischen Lösungsmittel Xylol entparaffiniert und über mehrere Zwischenstufen in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert:

Xylol I	5 Minuten
Xylol II	5 Minuten
100% Ethanol I	3 Minuten
100% Ethanol II	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten

Daraufhin wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Hämalaun gefärbt, dann gespült und für 7 Minuten in Leitungswasser stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine 7 minütige Gegenfärbung mit Eosin. Die Objektträger wurden in destilliertem Wasser gespült und schnell in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration gewaschen: 50% Ethanol, 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol. Danach folgten für eine Dauer von jeweils 3 Minuten 100% Ethanol, Xylol I, Xylol II, Xylol III. Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte in Shandon EZMount (1:1 Xylol) unter Deckgläsern eingebettet.

2.2.2 Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson(EvG)-Färbung ist eine Bindegewebsfärbung. Sie ermöglicht eine Unterscheidung von gelb gefärbter Muskulatur, rotem Kollagen sowie von elastischen Fasern und Zellkernen, die schwarz erscheinen. Bei der Elastika-van-Gieson-Färbung wurden die Objektträger auf bereits beschriebene Weise entparaffiniert und rehydratisiert. Danach erfolgte die Färbung mithilfe des Färbekits der Firma Merck. Zuerst blieben die Schnitte für 10 Minuten in Elastin nach Weigert bis sie für eine Minute unter fließendem Leitungswasser gespült und dann 5 Minuten mit Weigert A&B 1:1 gefärbt werden konnten. Dann wurde wieder für eine Minute unter fließendem Leitungswasser gespült, für eine Minute mit Pikrofuchsin-Lösung gefärbt und schließlich mit 70%igem Ethanol geklärt. Die aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung umfasste das schnelle Waschen mit 70%igem Ethanol, 96%igem Ethanol, 100%igem Ethanol und danach jeweils drei Minuten in 100%igem Ethanol, Xylol I, Xylol II und Xylol III. Die gefärbten Objektträger wurden mit Deckgläsern in Shandon EZMount (1:1 Xylol) eingedeckt. Die Auswertung der angefertigten Schnitte sowie deren Aufnahmen wurden mithilfe des Mikroskops des Typs Axioskop2 MOT der Firma Carl Zeiss durchgeführt.

2.3 Real-Time PCR

Zur Zerkleinerung wurden die Gewebestücke in einen Mörser überführt, mit flüssigem Stickstoff übergossen und klein gemörser. Dafür waren Mörser und Stößel auf Trockeneis vorgekühlt. Bis zur Weiterverwendung wurde das entstandene feine Pulver der Gefäße in Röhrchen bei -80°C aufbewahrt.

2.3.1 RNA-Isolation

Die auf der single-step Methode basierende RNA-Isolierung aus den zerkleinerten Gefäßstücken erfolgte an zwei Tagen:

Am ersten wurde 1 ml TRIzol (Invitrogen) zu jedem Röhrchen mit Gewebepulver hinzugefügt, wodurch die Proben lysierten. Einzeln fand eine Überführung in Zentrifugenröhrchen statt, die bereits mit 1 ml TRIzol gefüllt waren. Unter Verwendung einer Spritze und einer Kanüle (0,60 x 0,60 mm) wurde das Gewebe geschert. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform und kräftigem Schütteln per Hand kamen die Probenröhrchen für 15 Minuten bei 10.500 rpm in eine auf 4°C gekühlte Zentrifuge. Dadurch fand eine Phasentrennung statt. In der oberen Schicht befand

sich die RNA, in der mittleren DNA und die untere enthält Proteine im Phenol. Anschließend wurde die wässrige Phase mit der beinhaltenden RNA vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Daraufhin folgte über Nacht bei -20°C die Fällung mit Isopropanol (1:1).

Am zweiten Tag wurden die Reaktionsgefäße wieder für 15 Minuten bei 10.500 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Danach folgte das zweimalige Waschen des Pulvers mit 500 µl eiskalten 70%igen Ethanol und das Zentrifugieren für 15 Minuten bei 8.500 rpm. Nach 15-minütigem Trocknen an der Luft wurde das Pulver in 50 µl DEPC-Wasser (RNase-frei) aufgelöst.

2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte am NanoDrop ND-1000. Das zu untersuchende Material lagerte kurzfristig vor und während der Messung im Eiswasserbad. Es wurde jeweils ein Volumen von 1µl einer Probe gemessen. Ihre Reinheit wird durch die Quotienten zwischen A260/280 sowie A260/230 angezeigt. Die Kernsäuren absorbieren Licht besonders bei einer Wellenlänge von 260 nm und Proteine bei 280 nm. Die Ratio A260/280 zeigt Kontaminationen mit anderen Molekülen wie Proteinen oder Chemikalien wie Phenol an. Proben mit einem niedrigen A260/280 haben eine bedeutende Verunreinigung mit diesen organischen Komponenten, die später mit Prozessen wie der RT-PCR interferieren können und dadurch deren Effizienz verringern. Organische oder aromatische Stoffe und einige Reagenzien aus der RNA-Isolation absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 230 nm.

2.3.3 Elektrophorese

Zur weiteren Analyse der RNA und zur Überprüfung einerseits ihrer Integrität als auch andererseits auf mögliche Kontaminationen wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Dabei kam das Experion Automated Electrophoresis System mit dem RNA Standard Sens Kit von Bio-Rad zum Einsatz. Durch die Automatisierung des Prozesses konnte im Vergleich zur traditionellen Gelelektrophorese die Untersuchung schneller und sensitiver durchgeführt werden.

Dieser Standard Kit analysiert RNA Konzentrationen zwischen 5 bis 500 ng RNA/µl. Daher mussten vor dem Start alle Proben auf ungefähr gleiche Konzentrationen verdünnt werden. Außerdem wurden die Elektroden mit einem Reiniger von Bio-Rad

einzelnen gesäubert. Dann wurden die Reagenzien angesetzt. Zuerst wurden 600 µl RNA Gel für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1500g zentrifugiert, wodurch die sogenannte G-Lösung entstand. Durch Versetzen von 65 µl G-Lösung mit 1 µl der RNA-Lösung entsteht die GS-Lösung, welche vor jedem Experiment immer frisch angesetzt wird.

Zuerst wurde der Experion RNA StdSens Chip mit 9 µl der gerade frisch bereiteten GS-Lösung gefüllt. Sie musste in das weiß beschriftete und gelb unterlegte GS-Loch pipettiert werden. Nach einem Durchlauf von ca. 30 Sekunden auf einer Vorbereitungsstation sollte auf der Rückseite des Chips eine gleichmäßig klare Quarzoberfläche zu sehen sein, ohne Lufteinschlüsse in den Mikrokanälen. Daraufhin wurden die zwei übrigen Löcher mit jeweils 9 µl der GS-Lösung und der G-Lösung gefüllt.

Zum Laden des Puffers gehörten jeweils 5 µl des Ladepuffers in alle Löcher (1-12 plus L). Danach wurde jeweils 1 µl der Proben in die dafür vorgesehenen Probenlöcher pipettiert. Der fertig präparierte Chip wurde auf einen speziellen Vortexer gestellt. Vor Beginn der Messung muss überprüft werden, ob Luftblasen in den Löchern zu sehen sind. Tiefer sitzende Lufteinschlüsse, welche von der Lösung überdeckt sind, verringern den Durchmesser der Probenvertiefung durch eine veränderte Lichtbrechung deutlich. Luft wirkt als Isolator und macht daher die Elektrophorese unwirksam. Demzufolge müsste in diesem Fall die Luftblase beseitigt werden. Die Messung des geladenen Chips erfolgte im Experion System.

2.3.4 Reverse Transkription

Die Transkription der mRNA fand unter Verwendung des RevertAid First Strand cDNA Syntheses Kit der Firma Fermentas statt. Für die Umschreibung in cDNA wurde von jeder Probe eine Gesamtmenge RNA von 1000 ng eingesetzt. Dafür wurden zu Beginn alle RNA Proben mit einer individuell abgestimmten Wassermenge aus dem Kit versetzt, sodass ein Gesamtvolumen (RNA und H₂O) von 11 µl entstand.

Die Proben wurden auf einem Kühlakku in Reaktionsgefäße pipettiert und zu jeder 1,2 µl des Primers (dT) hinzugefügt. Das somit entstandene Gesamtvolumen von 12,2 µl in jedem Reaktionsgefäß wurde nach dem Verschließen gut gemischt und daraufhin bei 1000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend erfolgte im

Thermomixer eine Inkubation für 5 Minuten bei 65°C. Danach mussten die Reaktionsgefäße sofort wieder auf Eis gestellt werden.

Parallel dazu wurde ein Reaktionsmix angesetzt. Dafür benötigte man für jede Probe 4 µl von 5x ReactionsBuffer, 1 µl von RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl), 2 µl von 10mM dNTP Mix sowie 1 µl von RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/µl).

Jeweils 8 µl des hergestellten Reaktionsmix wurden zu den 12,2 µl des ersten Syntheseprodukts in die Reaktionsgefäße pipettiert, sodass ein Endvolumen von 20,2 µl entstand. Dieses wurde anschließend erneut gemischt, zentrifugiert und im Thermomixer inkubiert. Bei dem verwendeten Programm waren die Proben für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgte für 60 Minuten bei 42°C. Das anschließende 5-minütige Erhitzen der Proben auf 70°C beendete die Reaktion. Nach Abschluss des Programms wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C herabgekühlt und gelagert.

2.3.5 Primerdesign

Die als Startpunkt für die DNA-Replikation dienenden Oligonukleotide mussten so gebaut sein, dass sie spezifisch an einen ganz bestimmten, gewünschten DNA-Abschnitt binden. Somit wurde zuerst die Nukleotidsequenz ermittelt, um anschließend darauf basierend die spezifischen Primersequenzen synthetisch herstellen zu können.

Mithilfe der Datenbank von Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) wurden das genutzte nicht-regulierte Gen sowie die Transkriptsequenzen der Zielgene ermittelt. Darauf folgend konnte mit dem Programm „Primer 3“ das Primerdesign stattfinden. Die Primersequenzen sollten möglichst derart gestaltet sein, dass sie sich in unmittelbarer Umgebung der Sondensequenzen des Illumina-Chips aus dem Vorversuch befinden. Bei diesem handelt es sich um einen humanen Gen-Chip der Firma SIRS-Lab GmbH, Jena.

Die neu hergestellten Primer wurden auf Haarnadelstrukturen und Homo- bzw. Heterodimere überprüft sowie einer BLAST-Analyse (Altschul et al. 1990) unterzogen. Sie wurden mit DEPC-Wasser rekonstituiert und auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Die somit gewonnenen Stocklösungen der Oligonukleotide dienten zur Herstellung eines Primermixes, der zu gleichen Anteilen „forward“- und „reverse“-Primer mit einer Molarität von 2µM enthielt.

2.3.6 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Technik zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Sie basiert auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In Vitro wird die Replikation imitiert und so erfolgt eine millionenfache Vervielfachung bestimmter Gensequenzen. Bei jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt sich die Zahl der Kopien, was zu einer exponentiellen Amplifikation der Genabschnitte führt. Gleichzeitig findet während der ablaufenden PCR eine Quantifizierung der erhaltenen DNA durch Fluoreszenzmessung statt. Dies erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR, weil zu diesem kurzen Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen vorliegen, was für eine genaue Quantifizierung nötig ist. Dabei verhält sich das detektierte Fluoreszenzsignal des verwendeten Farbstoffs proportional zur Menge der PCR-Produkte. Je mehr Ziel-DNA vorhanden ist, desto stärker wird das gemessene Fluoreszenzsignal. Nach Ablauf der PCR, die in dieser Arbeit aus 40 Zyklen besteht, wurde daher auf diese Weise eine quantitative Auswertung vorgenommen. Die Auftrennung der PCR-Fragmente kann jedoch durchgeführt werden, um die Größe der Genabschnitte zu überprüfen.

Zur Detektion der entstandenen, doppelsträngigen DNA wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I benutzt. Er lagert sich an die kleine Grube der DNA an, weshalb sich die Fluoreszenz dieses Farbstoffs erhöht. Es bildet sich ein Komplex aus DNA und Fluoreszenzfarbstoff. Dieser Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Wenn bei der PCR mehr Produkte entstehen, dann verstärkt sich das Fluoreszenzsignal. Während jedes einzelnen PCR-Zyklus wird dieses Signal gebildet und gemessen. Schließlich erfolgt darüber die Quantifizierung der DNA.

2.3.7 PCR-Ansätze und Reaktionsbedingungen

Ein PCR-Ansatz bestand aus einem Endvolumen von 20 µl und beinhaltete folgende Komponenten:

- 10 µl 2x Rotor-Gene SYBR Green Master Mix
- 5 µl PrimerMix (fw/rv)
- 5 µl cDNA (mit 20 ng DNA-Template pro Ansatz)

Zur Feststellung möglicher selbstablaufender PCR-Prozesse wurde DEPC-Wasser gegen die 5 µl cDNA-Template ausgetauscht und für jeden einzelnen Primermix überprüft. In der PCR wurden ebenfalls 5 µl gepoolte cDNA verwendet, die die

gleiche Behandlung erfahren wie die verschiedenen PCR-Ansätze. Dies diente dem Ausschluss von Fehlern beim Ansetzen der PCR.

Der 2x Rotor-Gene SYBR Green Master Mix beinhaltet HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, Rotor-Gene SYBR Green PCR Puffer, Nukleotide und den Farbstoff SYBR Green I. Die Konzentration der einzelnen Bestandteile des Master Mix sowie der enthaltenen Kationen wird durch den Hersteller Qiagen bestimmt.

Die Probenansätze wurden auf Eis in Reaktionsgefäße pipettiert und darauffolgend am qPCR-Cycler Rotor-Gene Q der Firma Qiagen gemessen. Das verwendete Programm ermöglichte für alle Proben das Einstellen identischer Reaktionsbedingungen, bei denen die Primer gut funktionieren konnten.

Tabelle 1: Temperatur und Zeitprotokoll der RT-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95°C	10 min	Aktivierung der Polymerase
2	95°C	15 sec	Denaturierung des DNA-Doppelstrangs
3	60°C	30 sec	Primerhybridisierung
4	72°C	30 sec	Primer-Extension
5	40 Durchläufe: Wiederholen der Schritte 2 bis 4		Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts
6	Temperaturanstieg von 72°C auf 95°C	alle 3 sec Erhöhung um 0,5°C	Analyse der Schmelzkurve
7	Abkühlen auf 4°C		Beendigung der RT-PCR

Das β -Aktin wurde als nicht-reguliertes Gen genutzt und zur Berechnung verwendet. Deshalb erfolgte seine Messung dreifach. Bei sämtlichen anderen Proben wurde die RT-PCR in Einfachmessung durchgeführt.

2.3.8 CT-Wert-Bestimmung

Während der ablaufenden Real-Time-PCR fand eine Quantifizierung der entstandenen DNA statt. Dafür braucht man die so genannten Ct-Werte um

eventuelle Veränderungen in der Genexpression bei den verschiedenen Gruppen nachweisen zu können. Durch die Festlegung eines Schwellenwertes für die gemessene Fluoreszenzintensität werden die Ct-Werte ermittelt. Sie zeigen dann welche Probe vor Beginn der Amplifizierung mehr DNA beinhaltete.

Dabei bezeichnet der Ct-Wert denjenigen Zyklus der PCR, bei dem das emittierte Fluoreszenzsignal den vorher festgelegten Wert überschreitet. Je mehr DNA zu Anfang in den Reaktionsgefäßen war, desto schneller steigt im Laufe der PCR das Fluoreszenzsignal an und desto eher wird auch der festgelegte Grenzwert überschritten. Der muss für ein korrektes Ergebnis innerhalb der exponentiellen Phase liegen, damit für die ablaufende Reaktion optimale Bedingungen herrschen. Der Vergleich der Proben aus den verschiedenen Gruppen wurde ermöglicht, indem der Grenzwert für jede durchgeführte PCR immer an derselben Stelle festgesetzt wurde.

2.3.9 Schmelzkurvenanalyse

Nach Beendigung der aus 40 Zyklen bestehenden PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt indem eine langsame Temperaturerhöhung von 72°C auf 95°C stattfand. Während dieses Vorgangs wurde weiterhin die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Dabei wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt ein starker Abfall der Fluoreszenzintensität registriert, als die entstandenen PCR-Produkte sich in Einzelstrang-DNA aufspalteten. Dies war bei Erreichen der Schmelztemperatur T_m , die spezifisch für ein PCR-Amplifikat ist, der Fall. Das Denaturieren setzte den Farbstoff SYBR Green I frei, was die augenblickliche Abnahme der Fluoreszenz erklärt. Die Analyse der Schmelzkurve gestattet eine bedingte Charakterisierung von PCR-Produkten und damit ebenfalls eine Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen DNA-Fragmenten. An der Höhe des Schmelzkurven-Peaks kann die Menge des insgesamt entstandenen PCR-Produkts abgelesen werden.

2.3.10 Überprüfung der PCR-Produkte mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zusätzlich wurde nach Beendigung der quantitativen Real-Time PCR eine DNA-Gelelektrophorese mittels Agarose durchgeführt. Diese diente dem Nachweis möglicher unspezifischer PCR-Produkte und zeigte die Größe der DNA-Fragmente in Anzahl der Basenpaare an. Es wurden einige Stichproben aus den PCR-Produkten ausgewählt. Je 1 µl des Probenpuffers und 1 µl des Ladepuffers kamen in die beiden

randständigen Taschen des Gels. In jede andere Tasche dazwischen kamen je 3 µl DNA und 3 µl Ladepuffer. Somit entstand ein Gesamtvolumen von insgesamt 6 µl in diesen Taschen des Gels. Unter Nutzung eines 1,5%igen Agarose-Gels mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer ließen sich die DNA-Fragmente bei 90 V nach ca. 75 Minuten gut auftrennen. Der interkalierende Farbstoff SYBR-Green ermöglichte es nach Zugabe von 10 µl seiner 10.000fach konzentrierten Lösung die DNA-Banden auf dem Gel zu sehen. Mithilfe des Geldokumentationsgerätes SynoGBoxEF des Herstellers VWR sowie des Programms „GenTools“ erfolgte die Dokumentation der stattgefundenen Gelelektrophorese.

2.3.11 Relative Quantifizierung

Die Veränderung der Genexpression bei Venen und Arterien im Vergleich von Risikogruppe mit der Kontrollgruppe wurde mithilfe der relativen Quantifizierung bestimmt. Dabei wird die Genexpression eines bestimmten Zielgens mit einem anderen nicht regulierten und damit homogen exprimierten Gen verglichen.

Aus jeder Gruppe wurde der Mittelwert des Ct-Wertes für die verschiedenen Zielgene ermittelt. Für β-Aktin wurde aus der dreifachen Bestimmung in der RT-PCR ebenfalls der Mittelwert gebildet.

Von den so entstandenen Ct-Werten der Zielgene wurden die des β-Aktins subtrahiert, was dem ΔCt-Wert der einzelnen Gruppen entspricht. Den ΔΔCt-Wert von Venen und Arterien erhielt man indem die ΔCt-Werte der Kontrollgruppe von der Risikogruppe abgezogen wurden. Somit ist es möglich die Genexpression zu errechnen und einzuschätzen. Dafür wurde die folgende Formel nach Pfaffl angewandt: (Pfaffl 2001)

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct („sample“) - \Delta Ct („calibrator“)]}$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct (RA/RV) - \Delta Ct (KA/KV)]}$$

$$R = 2^{-[(Ct (RA/RV) - Ct („housekeeping“-Gen)) - (Ct (KA/KV) - Ct („housekeeping“-Gen))]}$$

Bei dieser ΔΔCt-Wert Methode wird davon ausgegangen, dass die PCR eine hundertprozentige Effizienz hat, das heißt bei jedem Zyklus sollte sich die DNA-Konzentration verdoppeln. Dies würde bei optimalen Voraussetzungen zutreffen. In

der Praxis sind die Raten niedriger. Zwischen Zielgen und Housekeeping-Gen dürfen aber keine großen Unterschiede in den Vervielfachungsraten je Zyklus auftreten.

2.4 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte von Arterien und Venen verwendet, die über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert waren. Die benutzten Antikörper und ihre Verdünnungen waren folgende:

Tabelle 2: Antikörper und ihre Verdünnungsfaktoren

Antikörper	Verdünnungsfaktoren
CD68 (mouse)	1:40
Stat 1(rabbit)	1:100

Zu Beginn wurden die Objektschnitte im organischen Lösungsmittel Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe über mehrere Zwischenstufen rehydratisiert:

Xylol I	5 Minuten
Xylol II	5 Minuten
100% Ethanol	5 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten

Für die Demaskierung der Antigene wurden die Paraffinschnitte für 20 Minuten mit einem Citratpuffer behandelt, der im Wasserbad auf 80°C erhitzt worden war. Mithilfe dieses Verfahrens erfolgte eine Freilegung der Epitope, die durch die Formalinfixierung verändert worden waren. Nachdem die Objektträger abkühlen konnten, wurden sie zwei Minuten lang in PBS gewaschen und dann mit DakoPen umrandet, einem wasserabweisenden Stift, der ein Verlaufen der Reagenzien verhindert.

2.4.1 Protokoll

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden Avidin und Biotin aus einem Blocking Kit verwendet. Dafür mussten 1000 µl von 20%igem FKS (fetales Kälberserum) mit 4 Tropfen Avidin versetzt werden. Diese Lösung inkubierte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurde dreimal für jeweils 3 Minuten mit PBS gespült. Anschließend folgte eine erneute 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer Lösung, die aus 1000 µl von 20%igem FKS und 4 Tropfen Biotin hergestellt worden war. Daraufhin war dreimaliges Waschen für jeweils 3 Minuten mit PBS nötig. Im Anschluss daran fand die Blockierung mit 1% BSA-PBS statt. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Ohne Abwaschen der BSA-PBS-Lösung wurde nun der Primärantikörper zugegeben. Die Objektträger verblieben danach über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer.

Am zweiten Tag wurden die Objektträger erneut dreimal für jeweils 3 Minuten mit PBS gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper aus der Flasche A des Dako-Red-Detection-System für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem wieder dreimal für jeweils 3 Minuten mit PBS gespült wurde, wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Streptavidin und Alkalischer Phosphatase aus Flasche B inkubiert. Darauf schlossen sich ein erneuter Waschdurchgang mit PBS und eine genau 7-minütige Inkubation der Gewebeschnitte mit Chromogenlösung bei Raumtemperatur an. Diese wurde unmittelbar vor Gebrauch wie folgt angesetzt:

10 ml Substratpuffer aus Flasche F vermischt mit einem Tropfen Levamisol aus Flasche G stellen die fünf Tage haltbare Substratarbeitslösung dar. Durch Zugabe von 30 µl Chromogen Red 1 (Flasche C), von 30 µl Chromogen Red 2 (Flasche D) und von 30 µl Chromogen Red 3 (Flasche E) zu 750 µl der Substratarbeitslösung entstand die oben bereits erwähnte Chromogenlösung. Nach deren Einwirken folgte ein Waschschrift mit PBS für 5 Minuten und danach mit Leitungswasser für 3 Minuten. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für 13 Minuten mit Hämalaun nachgefärbt, dann für 7 Minuten in Leitungswasser stehen gelassen, was den typischen Farbumschlag zu Blauviolett verursachte. Nach Ende dieses Schrittes wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt. Dieses Protokoll wurde für die Primärantikörper CD 68 sowie Stat 1 verwendet. Als Sekundärantikörper diente für

beide wie bereits beschrieben der biotinylierte Antikörper aus dem Dako-Red-Detextion-System.

2.5 Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Excel ausgehend von den ermittelten Stichproben berechnet. Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Bei dem Vergleich wurde ein signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt. Die Werte wurden mithilfe des Computerprogramms SPSS berechnet.

Ergebnisse

In der Untersuchung von potentiell an einer beschleunigten Graftsklerose beteiligten Faktoren wurden Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren eingeschlossen. Alle hatten sich einer aortokoronaren Bypassoperation an der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Jena im Jahr 2010 unterzogen. Die Risikogruppe bestand aus 22 Patienten mit Diabetes mellitus. Davon waren 86% Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 66,7 Jahren und einem Gewicht von 95,6 kg. Die Kontrollgruppe stellten 22 Patienten mit normalen HbA1c-Werten dar. Sie waren zu 82% männlich, durchschnittlich 63,8 Jahre alt und wogen 84,4 kg. (Tab.3) Es bestand dabei ein Unterschied im Gewicht und im HbA1c-Wert. Beides sind Risikofaktoren für eine Arteriosklerose sowie eine koronare Herzkrankheit und waren in der Risikogruppe signifikant höher.

Tabelle 3: Patientencharakteristik

	Kontrollgruppe (n=22)	Risikogruppe (n=22)
Alter (J)	63,8±8,1	66,7±7,9
Geschlecht (männlich in %)	81,8	86,4
Gewicht (kg) *	84±12 *	96±15 *
BMI *	28,5±4,3 *	32,4±4,2 *
Diabetes mel. (%)	0	100
HbA1c (%) *	6,2±0,5 *	7,5±1,4 *
Therapie	/	
diätetisch (%)	/	27,3
oral (%)	/	18,2
Insulin (%)	/	41,0
Raucher (%)	27,3	5,6
Art. Hypertonie (%)	100	100
Dyslipidämie (%)	72,7	100
Chron. Niereninsuffizienz (%)	0	18,2
Ejektionsfraktion (%)	52±13,8	53±14,6

Tab.3: BMI ist der Body Mass Index. Dieser berechnet sich aus dem Gewicht (kg) geteilt durch die Körpergröße (m) im Quadrat. Bei HbA1c handelt es sich um glykosyliertes Hämoglobin, welches ein Maß für den mittleren Blutzucker der vergangenen acht Wochen darstellt. Ein signifikanter Unterschied war für die mit * markierten Werte nachweisbar.

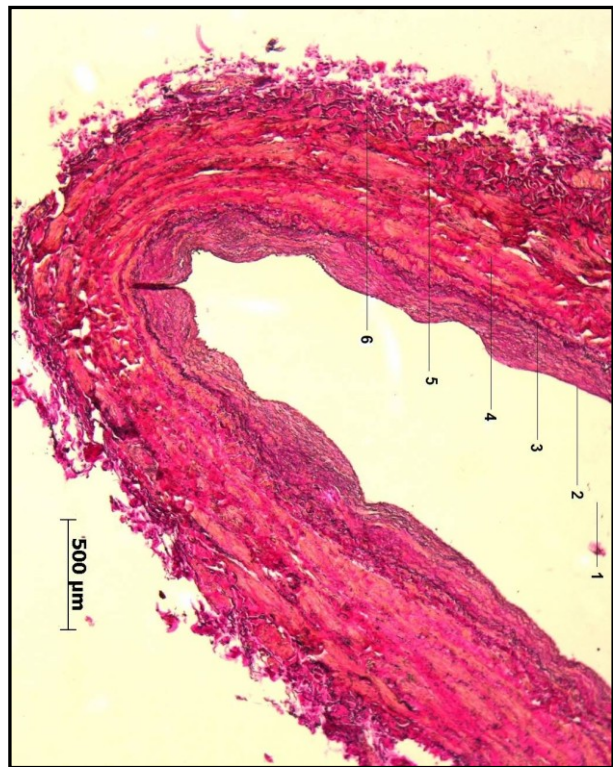
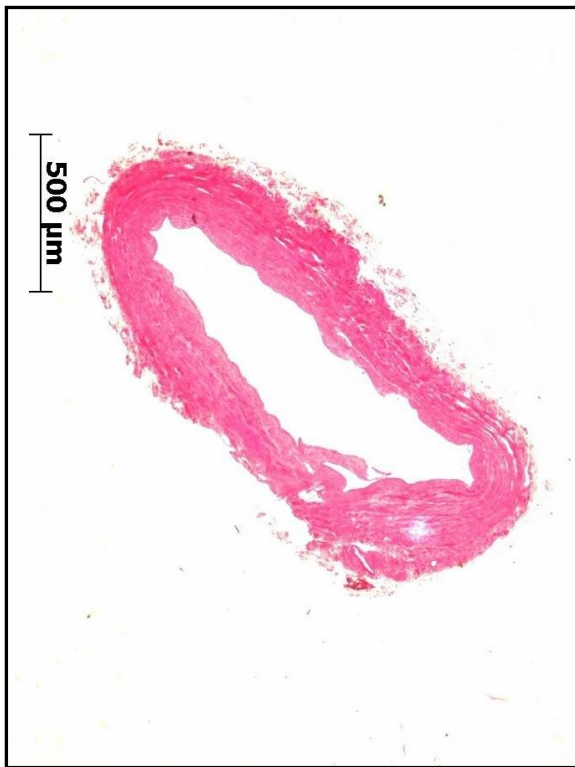
1. Resultate der histologischen Färbungen

1.1 Morphologie des Gefäßmaterials

Zur histologischen Untersuchung der venösen und arteriellen Gefäßquerschnitte wurden zwei Gewebefärbungen durchgeführt: Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verschafft einen Überblick über die Struktur des Gefäßes. Dabei erscheinen die Zellkerne blauviolett gefärbt. Elastische Fasern, kollagene Fasern und Zytoplasma werden rot bzw. rosa gefärbt. Die Elastika-van-Gieson-Färbung dient als Bindegewebsfärbung. Sie ermöglicht die Unterscheidung von rot gefärbtem Kollagen, gelber Muskulatur sowie von elastischen Fasern und Zellkernen, die schwarz erscheinen.

Die Abb.2+3 zeigen keine deutlichen Unterschiede in der Morphologie der Venen zwischen Kontrollgruppe und Risikogruppe. Die Aufnahmen A und B aus Abb.2 zeigen ein venöses Gefäß im Querschnitt eines Patienten ohne Diabetes mellitus. Die Aufnahmen A und B aus Abb.3 stellen die Vene eines Patienten aus der Risikogruppe dar.

Bei diesen untersuchten venösen Gefäßen ist der dreischichtige Wandaufbau aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia unscharf abgebildet. Die Muskelstränge der Media liegen bei den Venen nicht so dicht beieinander wie es bei Arterien der Fall ist. Sie werden von zahlreichen elastischen (schwarz) und kollagenen (rot) Fasern durchsetzt. Die Venen erscheinen in ihrem Querschnitt im Vergleich zu den Arterien eher lang gestreckt und weniger rund.



A

B

Abbildung 2: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Vene aus der Kontrollgruppe

(1) Lumen, (2) Tunica intima, (3) Membrana elastica interna, (4) Tunica media, (5) Membrana elastica externa, (6) Tunica adventitia

Aufnahme A zeigt den gesamten Querschnitt einer venösen Gefäßwand ohne Risikoprofil nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufnahme B ist eine Nahaufnahme derselben Vene in Elastika-van-Gieson-Färbung.



A **Abbildung 3: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Vene aus der Risikogruppe** **B**

Aufnahme A zeigt den gesamten Querschnitt einer venösen Gefäßwand eines Patienten mit Diabetes mellitus nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufnahme B ist eine Nahaufnahme derselben Vene in Elastika-van-Gieson-Färbung. Hier zeigt sich deutlich eine veränderte Struktur der Tunica intima mit Vergrößerung, was zu einer Lumeneinengung führt.

Die histologische Untersuchung der Venen zeigte beim Vergleich der Größen von Intima und Media in Relation zur gesamten Gefäßwandfläche keinen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Diabetes mellitus. (Tab.4)

Tabelle 4: Morphologie von Venen: Flächen der Gefäßwandabschnitte

	Vene Kontrolle (n=15)	Vene Risiko (n=15)
Fläche Intima	5,2±5,8	8,5±7,1
Fläche Media	13,9±11,3	16,9±11,5
Fläche Gesamt	29,9±23,2	37,2±23,3
Intima/Gesamt (%)	19,3±9,8	22,5±11,0
Media/Gesamt (%)	44,9±9,7	44,5±10,3

Tab.4: Mittelwerte der Flächen mit Standardabweichung

Bei zahlreichen Venen in beiden Gruppen war eine Intimaverdickung sichtbar. Sie ist ein Zeichen für eine beginnende Vaskulopathie schon zum Zeitpunkt der Bypass-Operation. Die feststellbare Veränderung der Struktur könnte zu einer Einengung und Versteifung der Gefäße führen. Sie äußert sich in einer histologisch nachweisbaren Intimaproliferation, möglicherweise infolge eines Endothelschadens.

Die arteriellen Gefäßproben wurden in vergleichbarer Weise behandelt und untersucht. Man erkennt auf den Bildern den dreischichtigen Wandaufbau der arteriellen Gefäße aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Abb.4 zeigt die Arterie eines Patienten ohne Diabetes mellitus. Es ist eine Arterie vom elastischen Typ ohne strukturelle Veränderungen. Der Aufbau ihrer Gefäßwand ist deutlich sichtbar und unterscheidet sich klar von dem der Venen. Bei allen untersuchten arteriellen Gefäßen der Kontrollgruppe zeigte sich ein morphologisch unauffälliges Bild. In den Aufnahmen von Abb.5 sind arterielle Gefäßquerschnitte eines Patienten mit Diabetes mellitus dargestellt. Die Arterien der Risikogruppe weisen geringfügige Veränderungen in der Intima auf.



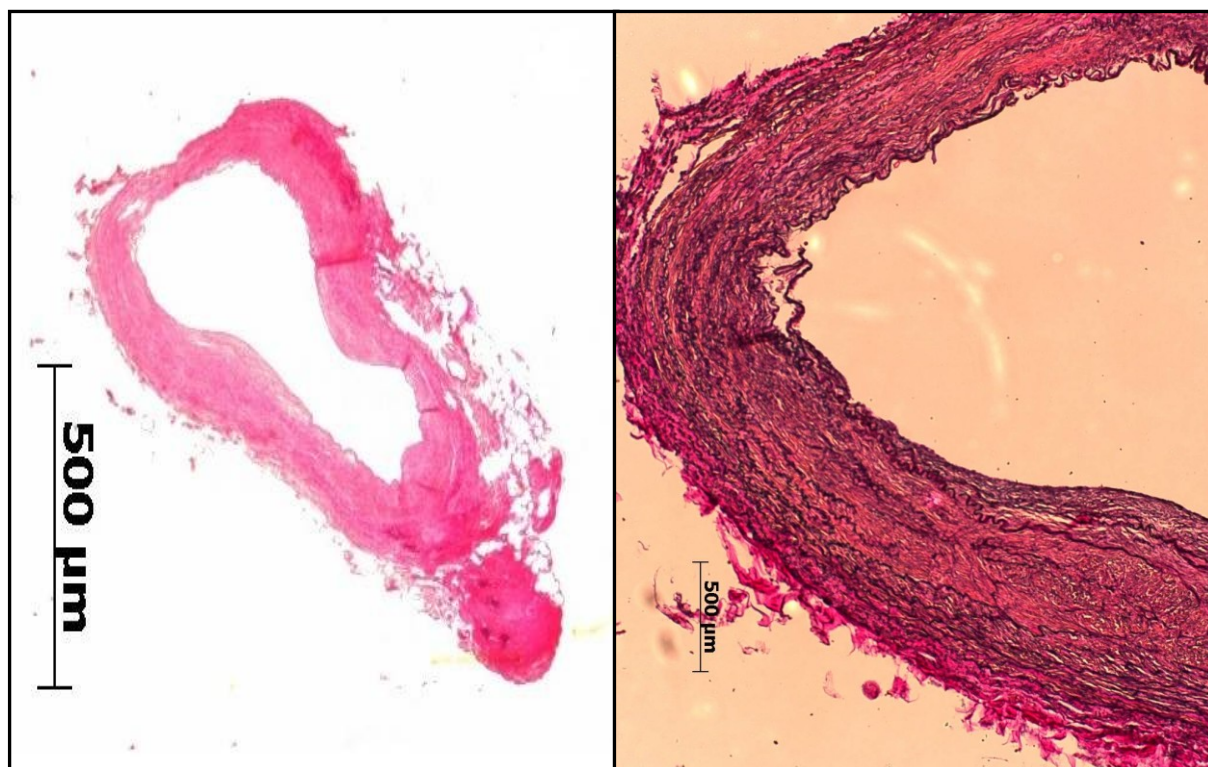
A

B

Abbildung 4: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Arterie aus der Kontrollgruppe

(1) Lumen, (2) Tunica intima, (3) Membrana elastica interna, (4) Tunica media, (5) Membrana elastica externa, (6) Adventitia

Aufnahme A zeigt den gesamten Querschnitt einer arteriellen Gefäßwand ohne Risikoprofil nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufnahme B ist eine Nahaufnahme derselben Arterie in Elastika-van-Gieson-Färbung.



A **B**
Abbildung 5: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Arterie aus der Risikogruppe

Aufnahme A zeigt den gesamten Querschnitt einer arteriellen Gefäßwand eines Patienten mit Diabetes mellitus nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufnahme B ist eine Nahaufnahme derselben Arterie in Elastika-van-Gieson-Färbung.

Auch bei den Arterien ließ sich kein Unterschied in der Größe von der Intima im Vergleich beider Patientengruppen nachweisen. (Tab.5) Ein Unterschied zeigte sich jedoch in der Media, die bei den arteriellen Gefäßen in der Kontrollgruppe größer ist. Es ist auffällig, dass die Media in Kontroll- und Risikogruppe bei den Arterien einen größeren Gefäßwandteil einnimmt als bei den Venen.

Tabelle 5: Morphologie von Arterien: Flächen der Gefäßwandabschnitte

	Arterie Kontrolle (n=14)	Arterie Risiko (n=13)
Fläche Intima	1,7±1,8	1,6±2,6
Fläche Media	10,9±11,5	8,3±13,4
Fläche Gesamt	17,9±18,2	20,0±32,5
Intima/Gesamt (%)	10,3±5,7	8,8±2,4
Media/Gesamt (%)	58,6±9,2	45,2±11,5

Tab.5: Mittelwerte der Flächen mit Standardabweichung

Zwischen Arterien und Venen war die Intimadicke in beiden Gruppen verschieden. So haben die venösen Gefäße eine viel ausgeprägtere Tunica intima als die arteriellen.

2. Molekularbiologische Identifikation von potentiell an einer Graftsklerose beteiligten Genen

2.1 Genchipanalyse von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus

In einem Vorversuch sollten Kandidatengene für eine beschleunigte Graftsklerose ermittelt werden. Dafür wurden die Arterien und Venen von Patienten, an denen eine aortokoronare Bypassoperation aufgrund von Arteriosklerose durchgeführt wurde, verwendet. Es gab jeweils eine Patientengruppe mit und eine ohne Diabetes mellitus in Kombination mit Niereninsuffizienz. In dieser vorhergehenden Arbeit wurden RNA-Proben der Blutgefäße auf humanen Genchips hybridisiert. Einige Gene waren in der statistischen Auswertung des Arrays bei den Venen der Risikogruppe verstärkt exprimiert. Diese Gene könnten somit bei der Arteriosklerose im koronararteriellen System von Bedeutung sein. (Abb.6)

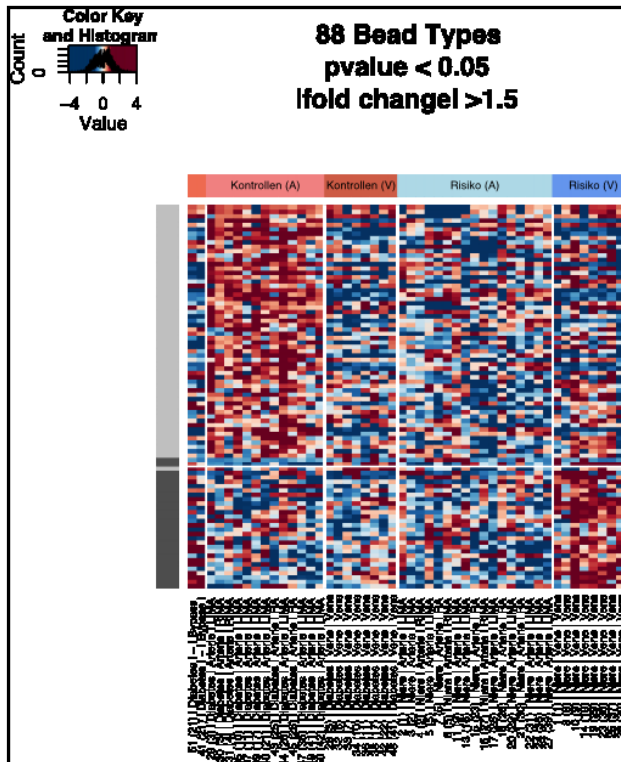


Abbildung 6: Heatmap aus der Genchipanalyse der vorhergegangenen Studie

Das Farben-Histogramm ist aufgeteilt nach Vene oder Arterie sowie Kontrollgruppe oder Risikogruppe. Dabei steht blau für eine verringerte Expression und rot für eine erhöhte Expression. Je dunkler der Farbton wird, desto größer ist der Expressionsunterschied.

Davon wurden die Gene Stat1 sowie HLA-DRB1 ausgewählt und deren Genexpression mittels quantitativer RT-PCR genauer bestimmt.

2.2 Nachweis von RNA-Integrität

Zur Untersuchung von potentiell an einer Graftsklerose beteiligten Genen wurden Arterien und Venen aus Kontrollgruppe sowie Risikogruppe verwendet. Die RNA wurde mithilfe der TRIzol-Chloroform-Methode aus den Gefäßstücken isoliert und anschließend erfolgte ihre Konzentrationsbestimmung am NanoDrop. Zur weiteren Analyse der RNA wurde ebenso eine Elektrophorese durchgeführt. Sie lief automatisiert ab und diente der Überprüfung der Integrität der RNA. (Abb.7)

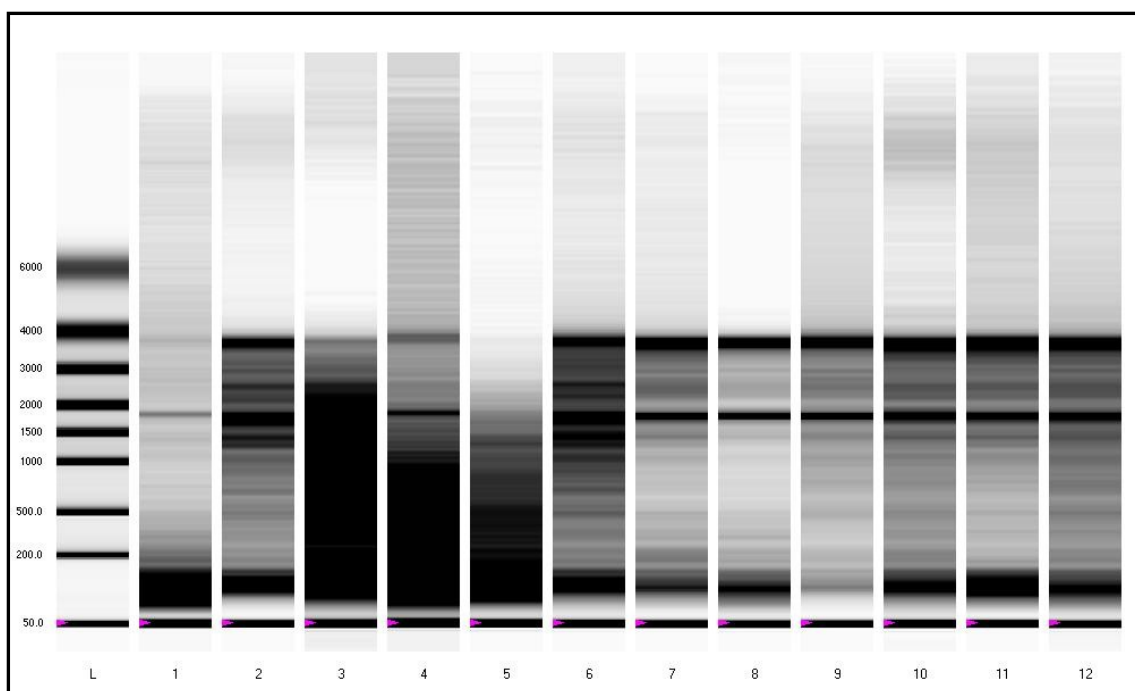


Abbildung 7: Elektrophorese der isolierten RNA aus den entnommenen Gefäßstücken

L zeigt die Zonen mit entsprechender Anzahl von Basen an. In 1-12 sind arterielle und venöse Gefäßproben dargestellt, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es gibt Proben mit deutlich sichtbarer 28S ribosomaler RNA und 18S rRNA (7, 8). Gefäßmaterial mit denaturierter RNA (1, 3) wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Die in L sowie 1-12 sichtbare unterste Zone entspricht einem 50 bp Marker, der in alle Proben hinzugefügt wurde. Dieser Marker sorgt in der automatisierten Elektrophorese für die korrekte Ausrichtung der Proben zum Größenmarker für die Anzahl der Basenpaare.

Dafür wurde von jeder Probe etwas isolierte RNA entnommen und aufgetrennt. Für einen Teil der untersuchten Proben ergaben sich deutlich voneinander abgrenzbare horizontale Zonen. Die obere entsprach der 28S ribosomalen RNA mit ca. 4000 Nukleotiden und die untere stellte die 18S rRNA mit ca. 1800 Nukleotiden dar. Um beide Banden herum waren weitere schwächer markierte Bereiche sichtbar. Diese repräsentierten die unterschiedlich großen Moleküle der mRNA, die nach ihrer

Basenanzahl aufgetrennt wurden. In den Gefäßproben 7 und 8 aus Abb.7 ließ sich nach der Auftrennung keine Degradation nachweisen. In den Gefäßproben 1 und 3 waren hingegen keine 28S und 18S rRNA zu sehen. Stattdessen verteilten sich die RNA-Fragmente entsprechend ihrer Basenanzahl. Zerstörte RNA oder Verunreinigungen können nachfolgende Untersuchungen beeinträchtigen. RNA Proben mit einem Elektrophoresemuster ohne 28S und 18S rRNA wurden aussortiert und fanden für die weiteren Untersuchungsmethoden keine Verwendung.

2.3 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse ausgewählter Zielgene

Auswertung quantitativer Real-Time PCR

Die Genexpression der ausgewählten Gene wurde mithilfe der Real-Time PCR untersucht. Zusätzlich erfolgte eine RT-PCR von β -Aktin. β -Aktin ist nicht reguliert und wurde nur für die Vergleichbarkeit der Proben und die Auswertung verwendet. Tab.6 zeigt die Genexpressionsänderung der ausgewählten Gene im Vergleich von Risikogruppe zu Kontrollgruppe.

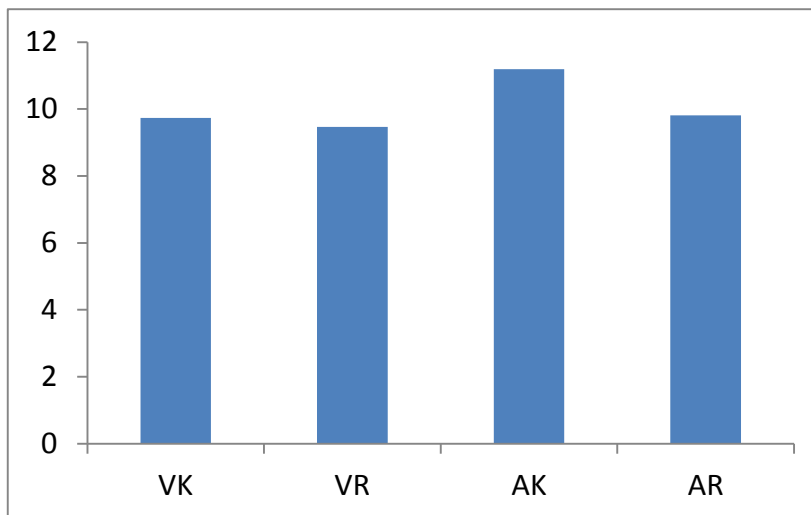
Tabelle 6: Änderung der Genexpression der Zielgene

	Stat1	HLA-DRB1
Vene	1,20	-1,37
Arterie	2,60	3,25

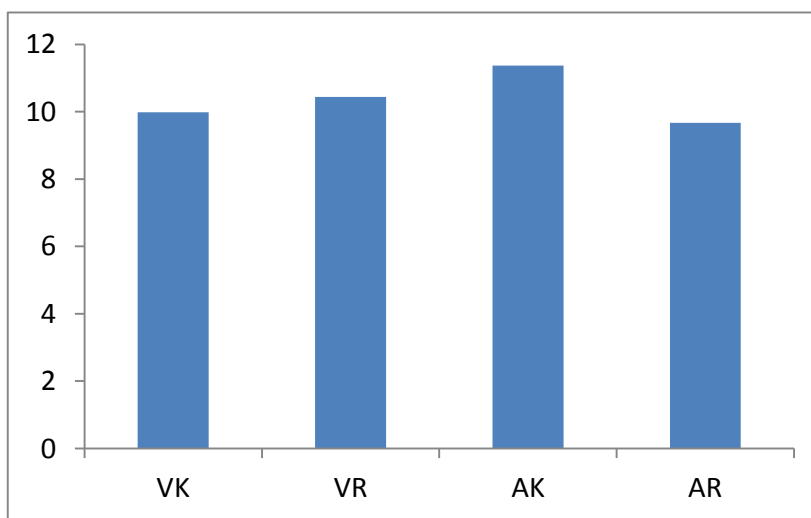
Tab.6: Änderung der Expression von Risiko zu Kontrolle („fold change“)

Von einer aussagekräftigen Änderung der Genexpression spricht man ab einem „fold change“ von 1,5 (>1,5-fach). Keines der beiden in der RT-PCR untersuchten Gene zeigte bei den Venen eine deutliche Veränderung der Genexpression zwischen Risikogruppe und Kontrollgruppe. Bei Stat1 war lediglich eine Tendenz für eine Heraufregulation zu sehen. Für HLA-DRB1 ergab sich sogar eine minimale Herabregulation der Expression von Risiko-Vene im Vergleich zur Kontroll-Vene.

Eine deutliche Erhöhung ließ sich für die arteriellen Gefäße nachweisen. Bei HLA-DRB1 war die Genexpression in der Risikogruppe etwa 225% höher als in der Kontrollgruppe. Stat1 wies eine deutliche Erhöhung von ca. 160% zwischen Risiko-Arterie gegenüber Kontroll-Arterie auf. Die verschiedenen Expressionsgrade sind in Abbildung 8 gezeigt. (Abb.8)



A



B

Abbildung 8: Darstellung der Expressionsgrade der untersuchten Gene

Die Expressionsgrade von Stat1 (A) und HLA-DRB1 (B) sind hier im Vergleich ihrer ΔC_t -Werte aufgetragen. Dabei ist im Vergleich von Kontroll- und Risikogruppe ein Unterschied bei den Arterien sichtbar. VK: Vene Kontrollgruppe; VR: Vene Risikogruppe; AK: Arterie Kontrollgruppe; AR: Arterie Risikogruppe

Auf der y-Achse wurden die Mittelwerte der jeweiligen ΔC_t -Werte aufgetragen. Deutlich wurde dabei in den Diagrammen der Unterschied der Genexpression innerhalb der Arterie bei Stat1 als auch bei HLA-DRB1. Auch bei der Betrachtung innerhalb einer Patientengruppe zeigte sich eine Differenz zwischen Venen und Arterien.

2.4 Charakterisierung der Produkte aus der RT-PCR

Nach Beendigung der quantitativen Real-Time PCR wurde stichprobenartig eine DNA-Gelelektrophorese mittels Agarose durchgeführt. Dies diente dem Nachweis der

Amplifikation von DNA-Sequenzen korrekter Länge und zeigte die Größe der DNA-Fragmente in Anzahl der Basenpaare an.

Tabelle 7: Größe der DNA-Fragmente

	HLA-DRB1	Stat1	b-Aktin
Anzahl der Basenpaare	171	159	133

Tab.7: erwartete Anzahl der Basenpaare der spezifischen PCR-Produkte

Die ermittelten Fragmentlängen stimmten mit den erwarteten überein. Es gab keine unspezifischen PCR-Produkte oder Primerdimere. Die Banden aus einer Produktprobe lagen immer auf derselben Höhe. (Abb.9)

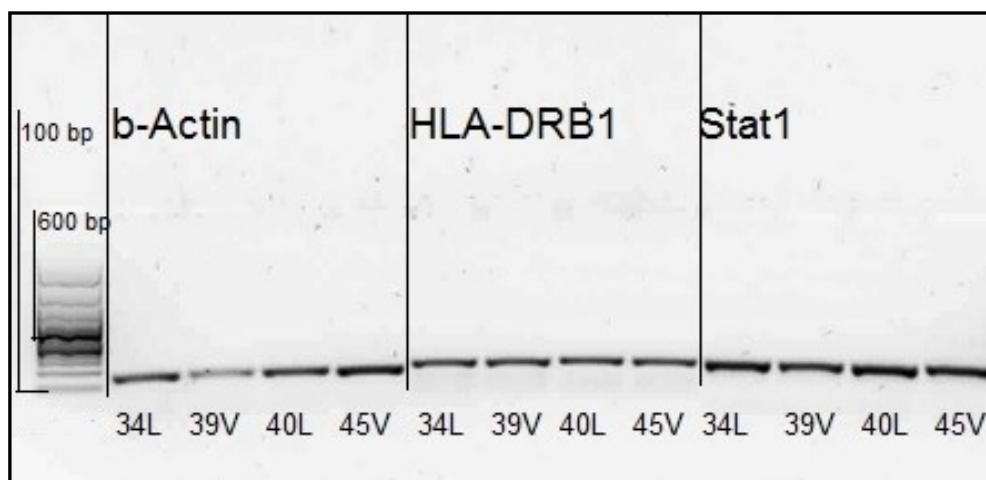


Abbildung 9: Überprüfung der PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese

Stichprobenartige Überprüfung von Amplifikaten der Zielgene aus der PCR zum Ausschluss von unspezifischen Reaktionen. Für alle Proben waren die erwarteten Fragmentlängen auf dem Gel ablesbar.

3. Resultate der immunhistochemischen Färbungen

3.1 Immunhistochemische Untersuchung von Genprodukten

Mit der Immunhistochemie sollte die Verteilung der Proteine im Gefäßquerschnitt analysiert werden. Dafür wurden verschiedenen Antikörper genutzt, die einzelne Proteine in den beiden untersuchten Patientengruppen, mit und ohne Diabetes mellitus, sichtbar machten. Die verwendeten 5 µm dicken Paraffinschnitte aus Gefäßstücken wurden immunhistochemisch gefärbt. Dadurch wurde ein violettes Signal erkennbar, was infolge der Reaktion des Antikörpers mit dem entsprechenden Protein in der Gefäßwand entstand. Die Gefäßquerschnitte wurden aufgenommen und die entstandenen Bilder zur weiteren Auswertung verwendet. Gemessen wurde

die jeweilige Signalstärke der Proteine pro Fläche in der Tunica intima. Auf diese Weise erfolgte der Nachweis von Stat1 und CD68. Sie stellen die Genprodukte von zwei Genen dar, die in der bereits genannten, vorhergehenden Arbeit im Array verstärkt exprimiert waren. Diese Genchipanalyse deutete auf eine potentielle Beteiligung von den Genen an einer beschleunigten Graftsklerose hin.

3.1.1 Immunhistochemische Untersuchung des Genprodukts von Stat1

Die Negativkontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers, sodass bei allen Gefäßquerschnitten von lediglich spezifischen Bindungen der Antikörper ausgegangen werden konnte. Das immunhistochemische Signal von Stat1 wies ein deutlicher sichtbares Muster auf als es bei CD68 der Fall war. Die violetten Markierungen von Stat1 waren in der Tunica intima und der Tunica media nachweisbar. (Abb.10+11)

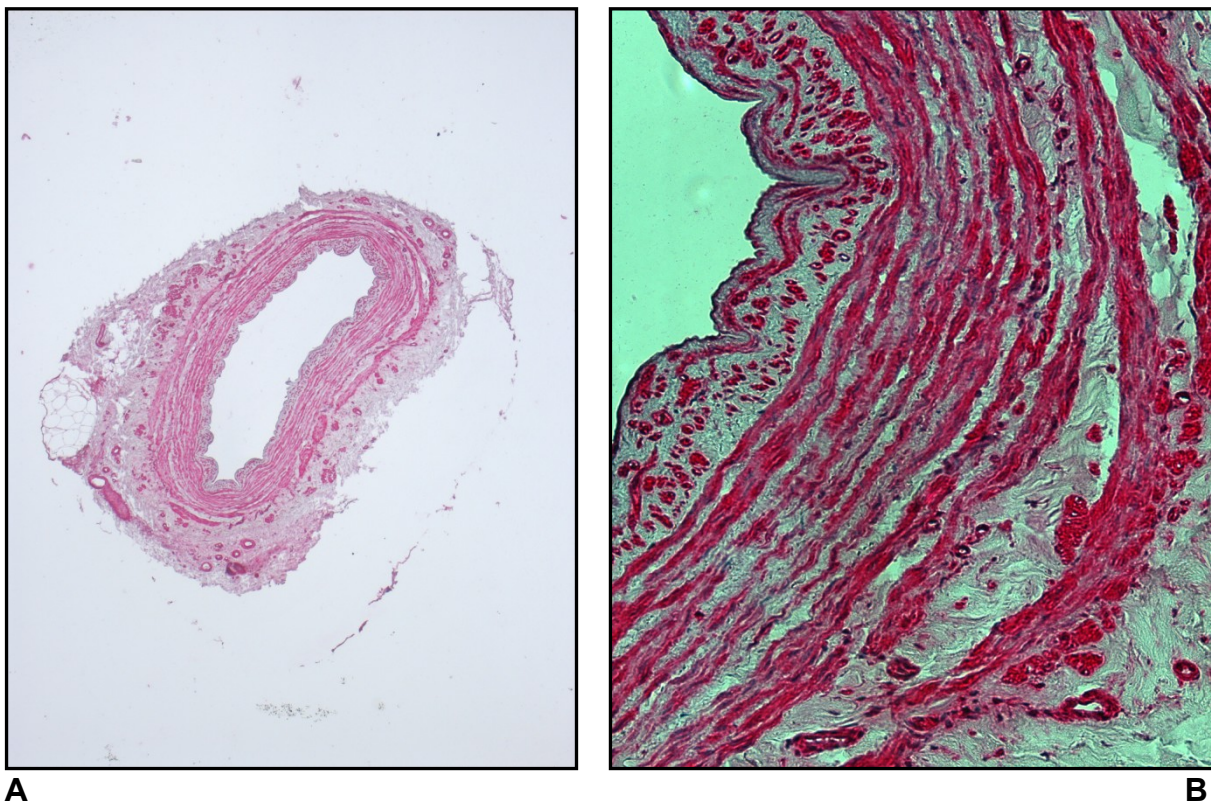
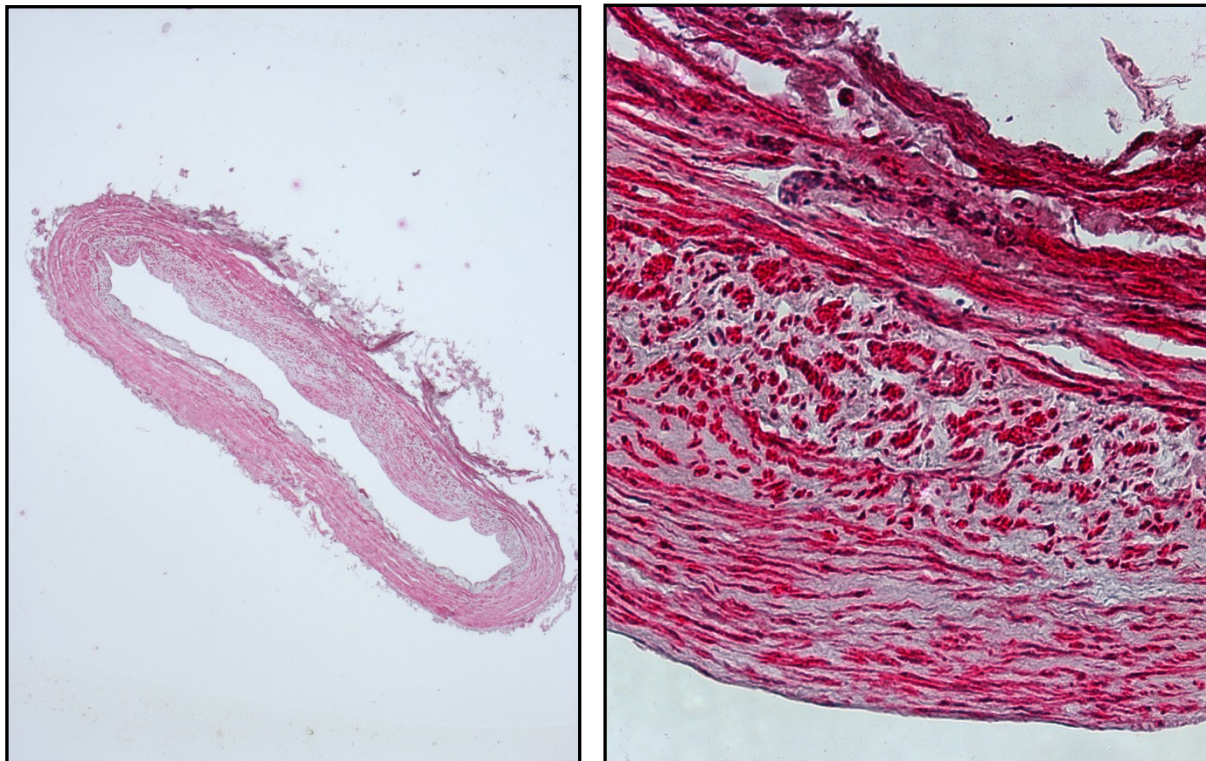


Abbildung 10: Immunhistochemie Stat1 einer Vene aus der Kontrollgruppe

A: Darstellung des gesamten Gefäßquerschnitts mit dem violetten Signal in Intima und Media in 2,5x Vergrößerung. B: 20x Vergrößerung derselben Vene. Hintergrundfärbung ist Hämalaun.



A

B

Abbildung 11: Immunhistochemie Stat1 einer Vene aus der Risikogruppe

A: Darstellung des gesamten Gefäßquerschnitts mit dem violetten Signal in Intima und Media in 2,5x Vergrößerung. B: 20x Vergrößerung derselben Vene. Die Hintergrundfärbung ist Hämalaun zur Anfärbung der Zellkerne.

In beiden Schichten befanden sich die Markierungen intrazellulär. Es sieht aus als befände sich das Signal in der Nähe des Zellkerns. Das Protein Stat1 spielt eine Rolle bei der Signalübertragung in den Zellkern und ist an der Transkriptionsaktivierung beteiligt. Das Signal aus der Media stellte sich dabei als flächenmäßig größer dar und war strangförmig verteilt. Im Vergleich der Signalstärke des Proteins pro Fläche in der Intima ließ sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und Risikogruppe nachweisen. Auch die Verteilung im Gefäßquerschnitt sowie die dortige Intensität waren nicht unterschiedlich. (Tab.8)

Tabelle 8: Immunhistochemie Stat1 von Venen: Fläche und Signal der Intima

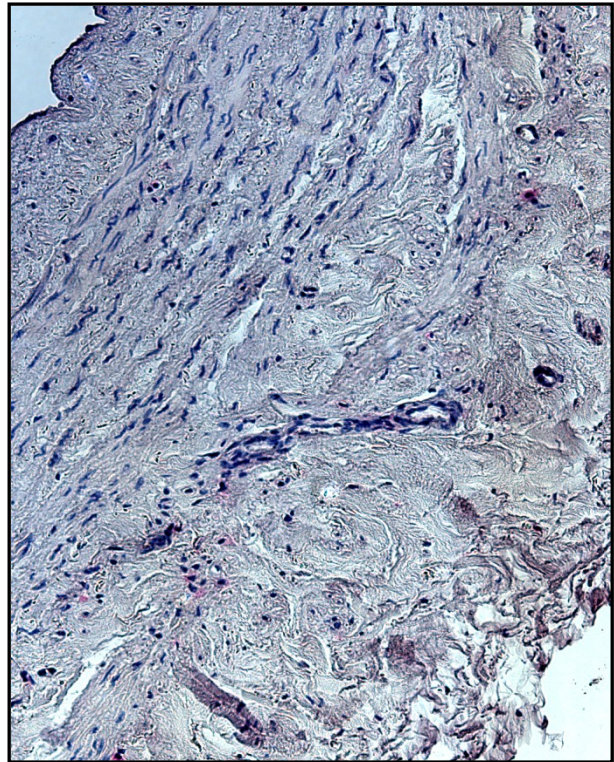
	Stat1 Kontrolle (n=15)	Stat1 Risiko (n=15)
Signal Intima	39,3±10,4	32,1±11,2
Fläche Intima	779499±525602	993701±555576
Signal/Fläche (x10 ⁻⁵)	8,4±6,3	4,7±4,1

3.1.2 Immunhistochemische Untersuchung des Genprodukts von CD68

Die immunhistochemischen Markierungen von CD68 waren sehr diskret in der Gefäßwand verteilt. Das blaue Signal, welches CD68 nachweist, kam am häufigsten in der Tunica media vor. (Abb.12+13)



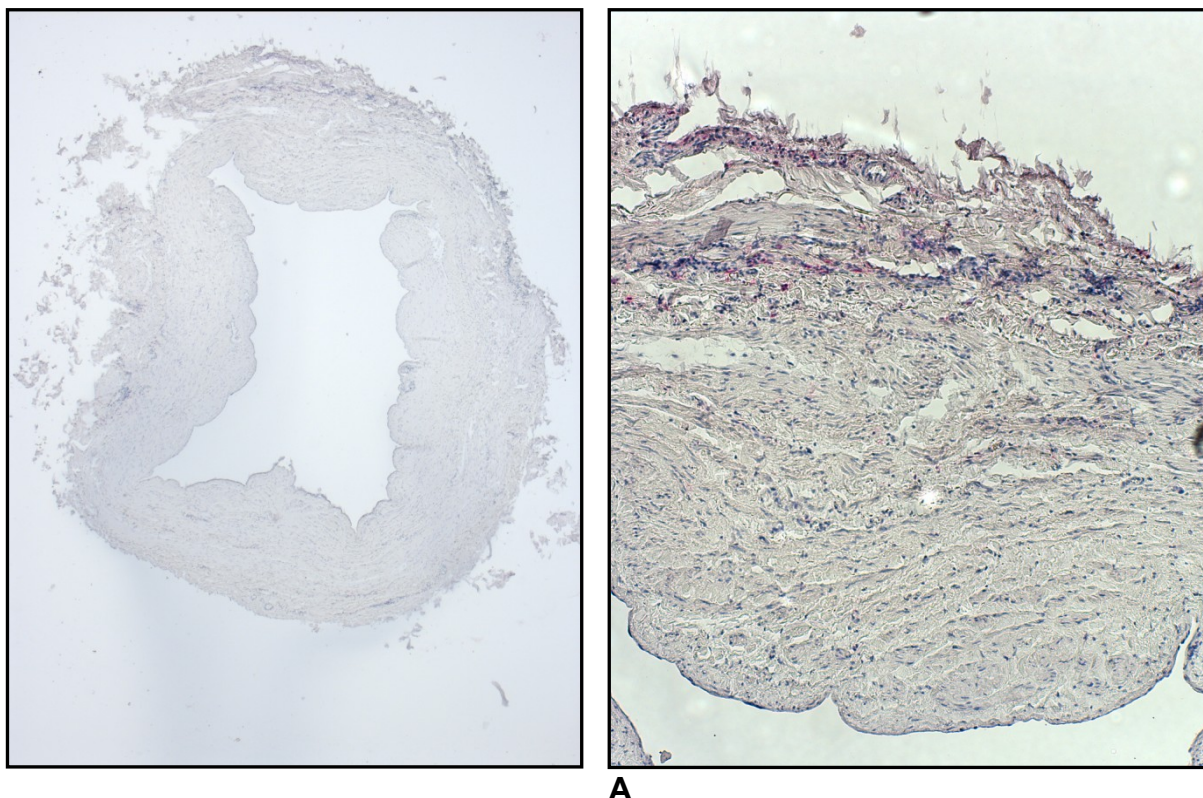
A



B

Abbildung 12: Immunhistochemie CD68 einer Vene aus der Kontrollgruppe

A: Darstellung des gesamten Gefäßquerschnitts mit dem blauen Signal in der Media in 2,5x Vergrößerung. B: 20x Vergrößerung derselben Vene. Die Hintergrundfärbung ist Hämalaun.



B

Abbildung 13: Immunhistochemie CD68 einer Vene aus der Risikogruppe

A: Darstellung des gesamten Gefäßquerschnitts mit dem blauen Signal in der Media in 2,5x Vergrößerung. B: 20x Vergrößerung derselben Vene. Die Hintergrundfärbung ist Hämalaun. Diese spezifischen Signale befanden sich immer um Zellkerne herum gruppiert.

Die Venen von Kontrollgruppe und Risikogruppe zeigten keine Unterschiede im Verteilungsmuster von CD68. Auch die Intensität des immunhistochemischen Signals in der Intima pro Fläche wies keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen auf. (Tab.9) Die Negativkontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers.

Tabelle 9: Immunhistochemie CD68 von Venen: Fläche und Signal der Intima

	CD68 Kontrolle(n=15)	CD68 Risiko (n=15)
Signal Intima	14,8±5,0	12,1±4,3
Fläche Intima	701080,8±564774	1180733,3±1107131
Signal/Fläche (x10 ⁻⁵)	4,9±5,1	3,1±3,9

Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war eine Beteiligung von ausgewählten Genen und deren Proteinen an einer beschleunigten Graftsklerose im Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern zu untersuchen. Es konnten hier keine Unterschiede in Genexpression und Proteinexpression zwischen Gefäßen von Patienten mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus gefunden werden. Demnach scheinen die Gene CD68, Stat1 und HLA-DRB1 und deren Proteine zum Entnahmezeitpunkt bei der Bypassoperation keinen Einfluss auf eine beschleunigte Graftsklerose zu haben. Auch morphologisch zeigten die Venen und Arterien keinen Unterschied zwischen Risiko- und Kontrollgruppe.

Für den Studienaufbau wäre zusätzlich eine Folgeuntersuchung der Graftgefäße mehrere Jahre postoperativ erstrebenswert gewesen, um möglicherweise eintretende Veränderungen bei Gen- und Proteinexpression erfassen zu können. Dies hätte einen Vergleich mit dem Operationszeitpunkt ermöglicht und somit eine Aussage darüber, ob CD68, Stat1 sowie HLA-DRB1 gegebenenfalls einen Einfluss auf die Entstehung einer Graftsklerose haben könnten, der erst in der Phase nach der Bypassoperation im Patienten einsetzt.

1. Auffälligkeiten in der Patientencharakteristik

In Risiko- und Kontrollgruppe unterscheiden sich die Patienten in einigen charakteristischen Punkten signifikant voneinander. So haben die Patienten der Risikogruppe einen höheren HbA1c Wert. Dies passt zur vorgenommenen Gruppeneinteilung, da das Entscheidungskriterium das Vorhandensein von Diabetes mellitus war. Dennoch bedeutet diese Abweichung, dass die Patienten in der Risikogruppe trotz einer bekannten Diabeteserkrankung nicht ausreichend therapiert waren. Sie leben unverändert mit erhöhten Blutzuckerspiegeln. Diese können somit weiterhin ihren schädigenden Einfluss ausüben und fördern möglicherweise das Voranschreiten der Arteriosklerose. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Diabetiker auch nach der Bypassoperation eine erhöhte Morbidität und Mortalität kardialer Ursache zeigen (Hueb et al. 2007). Der Fortschritt der Gefäßveränderung kann durch eine adäquate Behandlung eingeschränkt werden. So zeigten Nathan et al. ein reduziertes Voranschreiten der Intima-Media-Dicke an den Karotiden bei

Patienten mit intensiver Therapie des Diabetes mellitus und somit gut eingestellten Blutzuckerwerten (Nathan et al. 2003).

Auch das Gewicht und damit der BMI der Patienten in der Risikogruppe sind signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies lässt sich ebenfalls der vorgenommenen Einteilung zuschreiben, da Gewicht und Diabetes miteinander assoziiert sind und häufig zusammen als Symptomenkomplex wie beim metabolischen Syndrom auftreten. Das Gewicht spielt als Risikofaktor zweiter Ordnung für die Entwicklung der Arteriosklerose eine Rolle (Riede et al. 2004).

In der Patientencharakteristik ist der Anteil der Raucher in beiden Gruppen auffallend niedrig, insbesondere in der Risikogruppe. Nach den Erhebungen des Mikrozensus 2009 zu den Rauchgewohnheiten der erwachsenen Bevölkerung rauchen in Deutschland 30,5% der Männer (Statistisches-Bundesamt 2009), ohne Betrachtung ihres Gesundheitszustandes. In dieser Doktorarbeit besteht das Patientenkollektiv jedoch ausschließlich aus Menschen, bei denen eine Bypassoperation aufgrund von Veränderungen an den Koronargefäßen nötig war. Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, dass in der Kontrollgruppe 27,3% und in der Risikogruppe nur 5,6% der Patienten Raucher sind. Dies könnte auf einen Erfassungsfehler zurückzuführen sein. Es ist aber ebenso denkbar, dass diese Patienten durch ihre Krankheit und den häufigen Arztkontakt aufgehört haben zu rauchen.

Ein weiterer einflussnehmender Punkt ist die relativ niedrige Anzahl an Patienten in den beiden Gruppen. So wurden in die Risiko- als auch die Kontrollgruppe jeweils 22 Menschen mit einbezogen. Durch eine geringe n-Zahl nimmt jedoch die Aussagekraft einer Untersuchung ab. Dies bedeutet auch, dass Ausreißer eine größere Auswirkung auf das Endergebnis haben. Des Weiteren werden kleine Unterschiede schwerer nachweisbar. Das spiegelte sich unter anderem in der Statistik zur Morphologie wider.

2. Veränderungen der Gefäßwand in Venen und Arterien

Mithilfe histologischer Färbemethoden konnte der morphologische Aufbau der entnommenen Gefäße betrachtet werden. Es zeigte sich für die Venen beim Vergleich der Größen von Intima und Media in Relation zur gesamten Gefäßwandfläche kein Unterschied zwischen Risiko- und Kontrollgruppe. Die Grenze zwischen einer altersbedingten Intimaverdickung hin zur krankheitsverursachenden Intimaverdickung scheint fließend zu sein. In den Industriestaaten weisen nahezu

alle Menschen jenseits des 20. Lebensjahres arteriosklerotische Veränderungen in ihren Koronararterien auf (Tabas et al. 2007). Es ließ sich kein selektiver Einfluss des Diabetes mellitus an den entnommenen Venen unabhängig von weiteren Faktoren nachweisen. Vielmehr konnte bei zahlreichen Venen in beiden Gruppen eine Verdickung der Intima verzeichnet werden. Dies deutet darauf hin, dass die eingebauten venösen Bypässe schon zum Operationszeitpunkt pathologisch in ihrem Gefäßwandaufbau verändert sind. Es erscheint bedenklich für die Revaskularisierung Venen mit Zeichen einer beginnenden Vaskulopathie einzusetzen. Ein erneutes therapeutisches Eingreifen nach kurzer Zeit ist nicht unwahrscheinlich. Ein Jahr nach einer CABG liegt die Offenheitsrate einer V. saphena magna bei 84% und sinkt auf 61% nach zehn Jahren (Goldman et al. 2004). Diese hohen Verschlussraten könnten unter anderem auf den Zustand der Gefäßtransplantate zum Operationszeitpunkt zurückzuführen sein. Des Weiteren werden die Venen aus einem Niederdrucksystem in ein Hochdrucksystem umgesetzt. Damit stehen sie unter einer veränderten Belastung mit atypischen Druckverhältnissen sowie dem pulsatilen Blutfluss. Diese Faktoren können ebenso zu Umbauprozessen in der Gefäßwand und zu Obstruktionen führen (Campeau et al. 1983).

Bei allen untersuchten arteriellen Gefäßen in der Kontrollgruppe stellte sich die Morphologie der Gefäßwand unauffällig dar. Die Arterien in der Risikogruppe zeigten leichtgradige Veränderungen der Intima. Dennoch ließ sich kein Unterschied in der Dicke der Intima im Vergleich beider Patientengruppen nachweisen. Jedoch gibt es Differenzen zwischen Arterien und Venen. So haben die arteriellen Gefäße eine weniger ausgeprägte Tunica intima als die venösen. Die unterschiedliche Struktur der Gefäßwand von Arterien und Venen zum Operationszeitpunkt lässt sich auch mit dem langfristigen therapeutischen Erfolg in Zusammenhang bringen. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis nimmt die Bedeutung der arteriellen Revaskularisierung bei Bypassoperationen zu. Für die Verwendung der linken Arteria thoracica interna als Bypass auf den RIVA ist ein Überlebensvorteil nachgewiesen (Falk et al. 2002). Es gibt eine geringere Inzidenz von Myokardinfarkten, Angina pectoris und eine verringerte Rate an erneuten Revaskularisierungsmaßnahmen (Sergeant et al. 1998). Eine relative Widerstandsfähigkeit der A. thoracica interna gegenüber Arteriosklerose wurde von Gansera et al. beschrieben. Demnach wiesen diese Arterien histomorphologisch sowie immunhistochemisch keinen Unterschied

zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern auf. Der Einfluss des Diabetes mellitus blieb in Bezug auf die Gefäßwandveränderungen irrelevant (Gansera et al. 2004).

Bei den Arterien war ebenso auffällig, dass die Media in der Kontroll- als auch in der Risikogruppe einen größeren Gefäßwandabschnitt einnimmt als bei den Venen. Dies ist vereinbar mit den physiologisch vorherrschenden Blutdrücken, denen die Gefäße ausgesetzt sind. Denn je höher der mittlere Blutdruck bei peripheren Gefäßen ist, desto stärker ausgeprägt und muskelfaserreicher wird die Media. Die Arterien haben einen relativ gleichförmigen Bau mit einer dicken Media. Bei ihnen beträgt der mittlere arterielle Blutdruck etwa 100 mmHg. Die Venen hingegen sind verschiedenen Drücken ausgesetzt, hauptsächlich abhängig vom hydrostatischen Druck des Blutes. Im Stehen werden die Venen des Unterschenkels mit erheblich höheren Drücken belastet als die Venen oberhalb des Herzens. Dabei liegt ein Druckunterschied von ca. 90 mmHg vor. Deshalb sind die Wände der Venen abhängig von ihrer Lage verschieden aufgebaut und weisen im Allgemeinen eine dünnere Media als die entsprechende Arterie auf (Lüllmann-Rauch 2009).

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass nur das Frühstadium der Graftsklerose betrachtet wurde. Die untersuchten Arterien und Venen entstammen dem Operationszeitpunkt. Ein zu dieser Zeit nicht nachweisbarer Unterschied im Gefäßwandaufbau zwischen Risiko- und Kontrollgruppe kann auf einen erst später einsetzenden Prozess zurückzuführen sein. Zum Nachweis von postoperativen Veränderungen wären Proben einige Jahre nach der Bypassoperation als Kontrolle nötig.

3. Expressionsgrad der untersuchten Gene auf mRNA-Ebene

Die Genexpression der ausgewählten Zielgene Stat1 und HLA-DRB1 wurde mithilfe der RT-PCR untersucht. Die RT-PCR ist eine etablierte Methode zur relativen Quantifizierung von mRNA mit hoher Sensitivität und guter Reproduzierbarkeit. Die Expression der untersuchten Gene wird dabei auf ein nicht-reguliertes Gen wie z.B. β -Aktin bezogen. Mit der RT-PCR wird eine spezifische Menge mRNA sehr zuverlässig und sehr genau nachgewiesen (Pfaffl et al. 2002). Die angewandte $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfordert eine nahezu hundertprozentige Effizienz der PCR. Dies würde eine Verdopplung der DNA-Konzentration bei jedem Zyklus bedeuten und träfe bei optimalen Bedingungen zu. In der Praxis sind die Raten geringer. Wichtig ist, dass zwischen dem analysierten Zielgen und dem nicht-regulierten Gen keine

großen Unterschiede in den Vervielfältigungsraten je Zyklus auftreten (Pfaffl 2001, Livak und Schmittgen 2001).

In der Genchipanalyse des Vorversuchs ließen sich signifikante Unterschiede im Expressionsgrad der Zielgene nachweisen. Die Real-Time PCR von Stat1 und HLA-DRB1 lieferte hingegen abweichende Ergebnisse. Die Expression von Stat1 war in der Chipanalyse im Vergleich von Risiko- zu Kontrollgruppe verringert. Dies zeigte sich bei Venen und Arterien. In der später durchgeführten Real-Time PCR ließ sich tendenziell eine Heraufregulation der Stat1 Expression bei den Venen feststellen. Für die arteriellen Gefäße wies Stat1 eine Erhöhung der Expression von ca. 160% auf. Somit deuteten die Expressionsunterschiede von Stat1 bei Genchipanalyse und RT-PCR in unterschiedliche Richtungen. Bei HLA-DRB1 stimmten beide überein. So wies die Genexpression der Venen im Vorversuch eine sehr starke Verringerung in der Risikogruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In der Real-Time PCR zeigte sich bei den Venen auch eine Tendenz zu einer geringfügigen Herabregulation der Expression bei HLA-DRB1. Für die arteriellen Gefäße wies die Genchipanalyse auf eine Expressionserhöhung von HLA-DRB1 hin. Dies bestätigte sich auch in der Real-Time PCR mit einer erhöhten Genexpression von etwa 225%. Jedoch konnten die Ergebnisse aus der Genchipanalyse nicht vollständig in der Real-Time PCR validiert werden. Möglicherweise war daher die getroffene Auswahl der Zielgene trotz ihrer bekannten Beteiligung an arteriosklerotischen Abläufen nicht ideal. Das Fehlen von Expressionsunterschieden der Gene zwischen Risiko- und Kontrollgruppe bedeutet nicht zwingend, dass Stat1 und HLA-DRB1 nicht an der Arteriosklerose beteiligt sind. Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten haben eine Bypassoperation durchlaufen und besitzen arteriosklerotisch veränderte Blutgefäße. Daher ist es möglich, dass bei ihnen im Vergleich zu gesunden Menschen ein verändertes Expressionsmuster besteht und allein das selektive Merkmal Diabetes mellitus oder kein Diabetes mellitus nicht ausreichend für einen nachweisbaren Unterschied in der RT-PCR ist. Ebenso kann die fehlende bzw. nur teilweise Bestätigung der Ergebnisse der Genchipanalyse auf Unterschiede im Patientenkollektiv zurückzuführen sein. Die Rahmenbedingungen waren zwar die gleichen, dennoch sind in beide Studien nicht genau dieselben Patienten einbezogen worden.

Des Weiteren wurde im Ablauf der molekularbiologischen Untersuchung auch eine Elektrophorese durchgeführt. Dabei wies ein Anteil der Proben nicht das erwartete Bild mit den beiden deutlich voneinander abgrenzbaren 28S und 18S rRNA Zonen

auf. Dies spricht für eine Zerstörung der RNA oder für eine potentielle Verunreinigung. Deshalb wurden solche Proben mit entsprechendem Elektrophoresemuster aussortiert und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Erklärbar ist dieser Effekt durch eine mögliche längere Liegezeit der Gefäße im OP. Nach der Entnahme könnte die Integrität der RNA bis zur erfolgten Aufarbeitung im Labor angegriffen worden sein. Dies beeinträchtigt anschließende Untersuchungen und erfordert den Ausschluss solcher Proben. Dadurch reduzierte sich allerdings die Anzahl der Gefäßproben, was Auswirkungen auf die Aussagekraft der Untersuchung hat. Dies könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass die Unterschiede aus dem Vorversuch nicht bestätigt werden konnten. Die RT-PCR selbst hat jedoch funktioniert und lieferte zuverlässige Ergebnisse.

4. Proteinexpression in der Immunhistochemie

Für die Analyse der Proteinexpression mithilfe der Immunhistochemie in venösen Gefäßen wurden Stat1 und CD68 aus dem Vorversuch ausgewählt. Es erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Signalstärke der Proteine pro Fläche in der Tunica intima. Dabei ließen sich bei den Venen keine Unterschiede in der Proteinexpression im Vergleich von Risiko- und Kontrollgruppe nachweisen. Dies bestätigte somit die Ergebnisse aus der Real-Time PCR. Dort waren bei den Venen auf Genebene auch keine Expressionsunterschiede nachweisbar.

Das Protein Stat1 wies in der immunhistochemischen Färbung ein sehr deutliches Signalmuster auf. Die violetten Markierungen waren in der Tunica intima und der Tunica media sichtbar. Das Signal befand sich in Zellkernnähe und schien damit intrazellulär zu liegen. Dies stimmt mit den aktuellen Erkenntnissen zur Funktion von Stat1 überein, wonach es an der Signalübertragung in den Zellkern und der Transkription beteiligt ist. Daher ist es nachvollziehbar und stimmig bei der Immunhistochemie Stat1 zellkernnah nachweisen zu können.

Das immunhistochemische Signal von CD68 war sehr diskret in der Gefäßwand verteilt. Das Protein ließ sich am häufigsten in der Tunica media nachweisen, wobei sich die spezifischen Markierungen überwiegend intrazellulär zeigten. Dies ist nachvollziehbar, da CD68 vor allem bei Gewebsmakrophagen und humanen Monozyten exprimiert wird. Durch das Mitwirken von CD68 in diesen Zellen an der Phagozytose sowie am Metabolismus von Lysosomen leistet dieses Protein einen entscheidenden Anteil an dem Fortschreiten der Gefäßwandveränderungen.

Risiko- und Kontrollgruppe wiesen keinen Unterschied in der Signalintensität von Stat1 und CD68 in der Intima pro Fläche auf. Diese Ergebnisse stimmten mit der Real-Time PCR überein, bei der keine Unterschiede der Genexpression zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern nachgewiesen wurden. Auch war das Verteilungsmuster von Stat1 und CD68 in der Gefäßwand der Venen zwischen den beiden Gruppen nicht verschieden. Dies deutet darauf hin, dass das Vorhandensein von Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Proteinexpression und Verteilung hat. Fraglich bleibt, ob Stat1 und CD68 bei den untersuchten Patienten unverändert exprimiert worden sind wie bei gesunden Menschen ohne pathologisch veränderte Gefäße. Möglich wäre auch eine verstärkte Proteinexpression bei den Patienten in der Risikogruppe als auch in der Kontrollgruppe im Vergleich zu gefäßgesunden Menschen. Somit wäre in dieser Arbeit ebenfalls kein Unterschied in der Signalintensität zwischen diesen beiden Gruppen nachweisbar. Dafür hätte es einer Gruppe von gesunden Personen zum Vergleich bedurft.

Schlussfolgerung

Unter Einbeziehung aller Ergebnisse lässt sich feststellen, dass der Faktor Diabetes mellitus einzeln bis zur Bypassoperation keinen Unterschied in der Morphologie der Gefäßwand von Venen und Arterien verursacht. Die ausgewählten Gene CD 68, Stat1 und HLA-DRB1 und deren Transkripte wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen Risiko- und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich exprimiert. Sie beschleunigen damit beim Einsetzen der Gefäße als koronarer Bypass nicht die Graftsklerose im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus.

Literaturverzeichnis

- Agrawal S, Febbraio M, Podrez E, Cathcart MK, Stark GR, Chisolm GM. 2007. Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation*, 115 (23):2939-2947.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215 (3):403-410.
- Athanasiou T, Saso S, Rao C, Vecht J, Grapsa J, Dunning J, Lemma M, Casula R. 2010. Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty years of competition - which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*.
- Bartnik M, Ryden L, Ferrari R, Malmberg K, Pyorala K, Simoons M, Standl E, Soler-Soler J, Ohrvik J. 2004. The prevalence of abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease across Europe. The Euro Heart Survey on diabetes and the heart. *European heart journal*, 25 (21):1880-1890.
- Buxton BF, Raman JS, Ruengsakulrach P, Gordon I, Rosalion A, Bellomo R, Horrigan M, Hare DL. 2003. Radial artery patency and clinical outcomes: five-year interim results of a randomized trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 125 (6):1363-1371.
- Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J, Vaislic C, Grondin CM, Bourassa MG. 1983. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation*, 68 (3 Pt 2):II1-7.
- Cho KR, Kim JS, Choi JS, Kim KB. 2006. Serial angiographic follow-up of grafts one year and five years after coronary artery bypass surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 29 (4):511-516.
- Drechsler K, Fikenzer S, Sechtem U, Blank E, Breithardt G, Zeymer U, Niebauer J. 2008. The Euro Heart Survey - Germany: diabetes mellitus remains unrecognized in patients with coronary artery disease. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 97 (6):364-370.
- Edlin RS, Tsai S, Yamanouchi D, Wang C, Liu B, Kent KC. 2009. Characterization of primary and restenotic atherosclerotic plaque from the superficial femoral artery: Potential role of Smad3 in regulation of SMC proliferation. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 49 (5):1289-1295.
- Endres M, Laufs U, Merz H, Kaps M. 1997. Focal expression of intercellular adhesion molecule-1 in the human carotid bifurcation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 28 (1):77-82.
- Falk V, Walther T, Gummert JF, Mohr FW. 2002. [Arterial revascularization of coronary vessels]. *Herz*, 27 (5):426-434.
- Favaloro RG. 1968. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *The Annals of thoracic surgery*, 5 (4):334-339.
- Gansera B, Rohrbach H, Gillrath G, Vogel V, Angelis I, Kiask T, Neumaier-Prauser P, Nerlich A, Kemkes BM. 2004. Is there a difference between diabetic and non-diabetic ITAs? Histomorphological and immunohistochemical examinations of internal thoracic arteries. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 52 (5):255-260.
- Goldman S, Zadina K, Moritz T, Ovitt T, Sethi G, Copeland JG, Thottapurathu L, Krasnicka B, Ellis N, Anderson RJ, Henderson W. 2004. Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 44 (11):2149-2156.
- Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Ollier WE. 2004. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: influence of HLA-DRB1 alleles. *Autoimmunity reviews*, 3 (4):301-304.

- Hayward PA, Gordon IR, Hare DL, Matalanis G, Horrigan ML, Rosalion A, Buxton BF. 2010. Comparable patencies of the radial artery and right internal thoracic artery or saphenous vein beyond 5 years: results from the Radial Artery Patency and Clinical Outcomes trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 139 (1):60-65; discussion 65-67.
- Hedge PS, White IR, Debouck C. 2003. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Current opinion in biotechnology*, 14:647-651.
- Hortmann HC, Oliveira HG, Rabello RR, Rocha EA, Oliveira SC. 2010. Comparison of patency between radial artery and saphenous vein in a coronary artery bypass grafting post operative with return of the symptoms. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 25 (2):218-223.
- Hu X, Zhao Q. 2011. Systematic comparison of the effectiveness of radial artery and saphenous vein or right internal thoracic artery coronary bypass grafts in non-left anterior descending coronary arteries. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12 (4):273-279.
- Hueb W, Gersh BJ, Costa F, Lopes N, Soares PR, Dutra P, Jatene F, Pereira AC, Gois AF, Oliveira SA, Ramires JA. 2007. Impact of diabetes on five-year outcomes of patients with multivessel coronary artery disease. *The Annals of thoracic surgery*, 83 (1):93-99.
- Iffert W. 2009. Datenanalyse HTCh. SIRS Lab GmbH.
- Li N, McLaren JE, Michael DR, Clement M, Fielding CA, Ramji DP. 2010. ERK is integral to the IFN-gamma-mediated activation of STAT1, the expression of key genes implicated in atherosclerosis, and the uptake of modified lipoproteins by human macrophages. *Journal of immunology*, 185 (5):3041-3048.
- Lim WS, Timmins JM, Seimon TA, Sadler A, Kolodgie FD, Virmani R, Tabas I. 2008. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation*, 117 (7):940-951.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Lüllmann-Rauch R. 2009. Histologie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH, Genuth S. 2003. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, 348 (23):2294-2303.
- Nationale-Versorgungsleitlinie. 2013. Nationale Versorgungsleitlinie KHK.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29 (9):e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30 (9):e36.
- Remmele W. 1999. Pathologie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Riede U-N, Werner M, Schaefer H-E, Hrsg. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart: Thieme.
- Riede U-N, Werner M, Freudenberg N, Hrsg. 2009. Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie. Heidelberg: Springer.
- Sergeant PT, Blackstone EH, Meyns BP. 1998. Does arterial revascularization decrease the risk of infarction after coronary artery bypass grafting? *The Annals of thoracic surgery*, 66 (1):1-10; discussion 10-11.
- Statistisches-Bundesamt. 2009. Verteilung der Bevölkerung in ihrem Rauchverhalten in Prozent Bonn: Statistisches Bundesamt.
- Statistisches-Bundesamt. 2010. Todesursachen in Deutschland.
- Tabas I, Williams KJ, Boren J. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116 (16):1832-1844.

- The-BARI-Investigators. 2000. Seven-year outcome in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) by treatment and diabetic status. *Journal of the American College of Cardiology*, 35 (5):1122-1129.
- Thourani VH, Weintraub WS, Stein B, Gebhart SS, Craver JM, Jones EL, Guyton RA. 1999. Influence of diabetes mellitus on early and late outcome after coronary artery bypass grafting. *The Annals of thoracic surgery*, 67 (4):1045-1052.
- Weidtmann B. 2007. Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. *Internist*, 48:770-778.
- Wilson PW. 1994. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *American journal of hypertension*, 7 (7 Pt 2):7S-12S.
- World-Health-Organisation T-R-S. 1958. Classification of atherosclerotic lesions.4.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Temperatur und Zeitprotokoll der RT-PCR -----	27
Tabelle 2: Antikörper und ihre Verdünnungsfaktoren -----	30
Tabelle 3: Patientencharakteristik -----	33
Tabelle 4: Morphologie von Venen: Flächen der Gefäßwandabschnitte -----	36
Tabelle 5: Morphologie von Arterien: Flächen der Gefäßwandabschnitte -----	39
Tabelle 6: Änderung der Genexpression der Zielgene -----	42
Tabelle 7: Größe der DNA-Fragmente -----	44
Tabelle 8: Immunhistochemie Stat1 von Venen: Fläche und Signal der Intima -----	46
Tabelle 9: Immunhistochemie CD68 von Venen: Fläche und Signal der Intima -----	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: KHK als häufigste Todesursache im Jahr 2010 in Deutschland-----	7
Abbildung 2: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Vene aus der Kontrollgruppe -----	35
Abbildung 3: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Vene aus der Risikogruppe -----	36
Abbildung 4: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Arterie aus der Kontrollgruppe -----	38
Abbildung 5: Histologische Darstellung der Gefäßwand einer Arterie aus der Risikogruppe -----	39
Abbildung 6: Heatmap aus der Genchipanalyse der vorhergegangenen Studie ---	40
Abbildung 7: Elektrophorese der isolierten RNA aus den entnommenen Gefäßstücken -----	41
Abbildung 8: Darstellung der Expressionsgrade der untersuchten Gene -----	43
Abbildung 9: Überprüfung der PCR-Fragmente mittels Agarose- Gelelektrophorese -----	44
Abbildung 10: Immunhistochemie Stat1 einer Vene aus der Kontrollgruppe-----	45
Abbildung 11: Immunhistochemie Stat1 einer Vene aus der Risikogruppe-----	46
Abbildung 12: Immunhistochemie CD68 einer Vene aus der Kontrollgruppe -----	47
Abbildung 13: Immunhistochemie CD68 einer Vene aus der Risikogruppe -----	48

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Seybt
Vorname	Ulrike
Geburtsdatum	05.03.1989
Geburtsort	Gera

Schulbildung

1995-1999	14. Grundschule Gera
1999-2007	Karl-Theodor-Liebe Gymnasium
2007	Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 2007	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich- Schiller Universität Jena
August 2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 2010	Aufnahme der Promotionsarbeit an der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie Jena
Dezember 2013	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika/Berufliche Praxis

07.-10.2007	Pflegepraktikum Viszeralchirurgie SRH Waldklinikum Gera
02.-03.2010	Famulatur Kardiologie RoMed Klinikum Rosenheim
02.-03.2011	Famulatur Unfallchirurgie SMZ Ost Donauspital Wien

07.-08.2011	Famulatur Anästhesie und Schmerztherapie Universitätsklinikum Jena
02.-03.2012	Famulatur Orthopädie Helios Klinikum Erfurt
08.-12.2012	PJ-Tertial Gastroenterologie/Onkologie Katholisches Krankenhaus St. Nepomuk Erfurt
12.-03.2012/13	PJ-Tertial Orthopädie Helios Klinikum Erfurt
03.-07.2013	PJ-Tertial Mund-Kiefer- Gesichtschirurgie und Herzchirurgie Universitätsklinikum Jena
März 2014	Assistenzärztin Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie Klinikum Wolfsburg

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. med. Torsten Doenst für seine Unterstützung und sachkundige Anleitung bedanken, sowie bei den Mitarbeitern der Herz- und Thoraxchirurgie Jena, die mir die Durchführung meiner Arbeit erst ermöglicht haben.

Weiterhin bin ich meinem Betreuer aus der Forschungsabteilung der Herz- und Thoraxchirurgie Dr. rer. nat. Michael Schwarzer sehr dankbar für die jederzeit gewährte fachliche Beratung sowie Hilfsbereitschaft. Auch für das mühevollen Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben. Darüber hinaus geht mein Dank an meinen Freund, der mich immer bestärkt hat, mein Promotionsvorhaben voranzutreiben und durchzuführen.

Außerdem danke ich allen Freunden, die mich jederzeit mit viel Geduld und Verständnis unterstützten und mir halfen Schwierigkeiten zu bewältigen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Torsten Doerst, Dr. rer. nat. Michael Schwarzer

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Ulrike Seybt